

# **Untersuchungen zur Pathogenese der Felines Infektiösen Peritonitis mittels reverser Genetik**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs 08-Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
**M.Sc. Danica Spies**

Gießen  
Dezember 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2008 bis Dezember 2012 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel am Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif  
Fachbereich Biologie und Chemie  
Institut für Biochemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Institut für Virologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 12.02.2013

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Danica Spies

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Coronaviren.....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Morphologie.....	4
1.1.3 Genomorganisation .....	5
1.1.4 Der coronavirale Replikationszyklus.....	6
1.1.4.1 Replikation und Transkription.....	7
1.1.4.2 Proteolytische Prozessierung.....	9
1.2 Feline Coronaviren.....	10
1.3 FIP .....	13
1.4 Reverse Genetik mit Coronaviren .....	15
1.5 Coronaviren als Vektor.....	19
1.6 Zielsetzung.....	21
<b>2 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1 Geräte .....	23
2.2 Chemikalien .....	24
2.3 Enzyme und Puffer.....	25
2.4 Kits .....	26
2.5 Molekulargewichtsstandards .....	26
2.6 Oligonukleotide für RT-PCR und PCR .....	27
2.6.1 Oligonukleotide für das FCoV Genom (Stamm 79-1146) .....	27
2.6.2 Oligonukleotide für das FCoV Genom (Stamm Black).....	31
2.6.3 Oligonukleotide für das Vaccinia Virus Genom (Stamm vNotI/tk).....	32
2.6.4 Oligonukleotide für das FCV Genom (Stamm 2024), ORF 2 und ORF 3 .	32
2.6.5 Oligonukleotide für das Reportergen GFP .....	33
2.6.6 Oligonukleotide für Plasmide .....	33
2.7 Medien, Lösungen und Puffer .....	33
2.7.1 Allgemeine Medien und Puffer .....	33
2.7.2 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten .....	34
2.7.3 Medien und Puffer für das Arbeiten mit Bakterien ( <i>E. coli</i> ) .....	34
2.7.4 Medien und Puffer für das Arbeiten mit Säugerzellen .....	35
2.7.5 Puffer für Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.7.6 Puffer für DNA-Isolierung und Aufreinigung .....	37
2.8 Zellen .....	37

2.8.1 Eukaryontische Zellen .....	37
2.8.2 Prokaryontische Zellen .....	38
2.9 Viren.....	38
2.10 Plasmide .....	38
2.11 Antikörper.....	38
2.12 Verbrauchsmaterialien .....	39
<b>3 Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.1 Methoden zur Präparation von DNA .....	40
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	40
3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese .....	41
3.1.3 Reinigen von DNA .....	41
3.1.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation.....	41
3.1.3.2 Aufreinigen von DNA-Fragmenten .....	42
3.1.3.3 Gelextraktion.....	42
3.1.4 DNA-Isolierung .....	42
3.1.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab	42
3.1.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab	43
3.1.4.3 Isolierung von DNA (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen im analytischen Maßstab .....	43
3.1.4.4 Isolierung von DNA (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen im präparativen Maßstab .....	43
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.1.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	44
3.1.7 DNA-Sequenzierung.....	45
3.2 Methoden zur Klonierung von DNA.....	45
3.2.1 Restriktion .....	45
3.2.2 Dephosphorylierung .....	45
3.2.3 Ligation.....	45
3.3 Mikrobiologische Methoden .....	46
3.3.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien .....	46
3.3.2 Transformation von Bakterien .....	46
3.3.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	46
3.3.2.2 Transformation durch Hitzeschock.....	47
3.4 Arbeiten mit RNA .....	47

3.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen.....	47
3.4.2 RNA-Isolierung aus Plasma, Serum, Urin oder Zellkulturmedium .....	47
3.4.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	48
3.4.4 <i>In vitro</i> Transkription .....	48
3.5 Proteinbiochemische Methoden .....	49
3.5.1 Zellyse .....	49
3.5.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
3.5.3 Western Blot .....	50
3.6 Zellbiologische Methoden .....	50
3.6.1 Kultivierung von Säugetierzellen .....	50
3.6.2 Kryokonservierung von Zellen .....	51
3.6.3 Bestimmung der Zellzahl .....	51
3.6.4 Färbung adhärenter Zellen mit Kristallviolett .....	52
3.6.5 Infektion von Zellen .....	52
3.6.6 Transfektion von RNA und DNA in Säugetierzellen.....	52
3.6.6.1 Chemische Transfektion .....	52
3.6.6.2 Physikalische Transfektion.....	53
3.6.7 Zellisolierung .....	53
3.6.7.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMC) aus Blut.....	53
3.6.7.2 Isolierung von feline Monozyten mittels Plastikadhärenz .....	54
3.6.7.3 Isolierung von feline CD13- und CD14-positiven Zellen.....	54
3.6.8 Zellanalyse .....	55
3.6.8.1 Fluoreszenzzytometrie .....	55
3.6.8.2 Zellfärbung .....	57
3.6.8.3 Fluoreszenzzytometrische Analyse der isolierten Zellen .....	58
3.7 Arbeiten mit Viren.....	59
3.7.1 Titerbestimmung.....	59
3.7.2 Wachstumskurven .....	59
3.7.3 Selektion von rekombinanten Vaccinia Viren .....	59
3.7.3.1 Positivselektion .....	59
3.7.3.2 Negativselektion.....	61
3.7.4 Herstellung von rekombinanten Viren.....	61
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>

4.1 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten feline Coronaviren ..	65
4.1.1 Herstellung von vrekFCoV $\Delta$ 1b, 3'UTR .....	66
4.1.2 Herstellung von vrekFCoV 79-1146.....	71
4.1.2.1 Positivselektion I .....	72
4.1.2.2 Negativselektion I.....	74
4.1.2.3 Positivselektion II .....	77
4.1.2.4 Negativselektion II.....	79
4.1.3 Gewinnung des rekombinanten Serotyp II FCoV (rekFCoV 79-1146) .....	83
4.1.4 Charakterisierung von rekFCoV 79-1146 .....	86
4.1.4.1 Nachweis der Markermutationen .....	87
4.1.4.2 Wachstumskinetik .....	87
4.1.4.3 Plaquemorphologie .....	88
4.1.5 Infektion von Katzen .....	89
4.1.6 Herstellung von vrekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop, vrekFCoV 79-1146 $\Delta$ S und vrekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop; $\Delta$ S .....	93
4.1.7 Gewinnung von rekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop, rekFCoV 79-1146 $\Delta$ S und rekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop; $\Delta$ S .....	95
4.1.8 Wachstumsverhalten von rekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop, rekFCoV 79-1146 $\Delta$ S und rekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop; $\Delta$ S .....	97
4.2 Feline Coronaviren als Vektor .....	98
4.2.1 FCoV als Vektor für das Reportergen GFP .....	99
4.2.1.1 Wachstumskinetik .....	103
4.2.1.2 Plaquemorphologie .....	104
4.2.2 Expression von caliciviralen Genen.....	105
4.3 Treffzellen für feline Coronaviren .....	109
4.3.1 Isolierung und Analyse von feline PBMC.....	110
4.3.2 Infektion von feline PBMC und CD14-positiven Zellen mit rekFCoV 79- 1146, GFP .....	113
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>120</b>
5.1 Genomorganisation von Serotyp II FCoV 79-1146.....	121
5.2 Serotyp II FCoV 79-1146 als Ausgangsvirus .....	123
5.3 Pathogenese der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP) .....	124
5.4 Coronaviren als Vektoren.....	126
5.5 Treffzellen für feline Coronaviren .....	129

<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>136</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>138</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>140</b>
<b>9. Literatur .....</b>	<b>146</b>
<b>10. Publikationen, Vorträge und Poster .....</b>	<b>174</b>
10.1 Publikationen.....	174
10.2 Vorträge .....	174
10.3 Poster.....	174
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>175</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Coronaviren

### 1.1.1 Taxonomie

Die Virusfamilie *Coronaviridae* gehört zusammen mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* zu der Ordnung *Nidovirales* und umfasst die zwei Unterfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae* (de Groot et al., 2012). Viren der Ordnung *Nidovirales* weisen Gemeinsamkeiten auf, die sie von anderen, nichtsegmentierten Positivstrang RNA-Viren unterscheiden. Die wesentlichen Merkmale, die alle Nidoviren gemeinsam haben, sind die Transkription eines Satzes von 5'- und 3'-koterminalen, subgenomischen (sg) *messenger* RNAs (mRNAs), die Expression eines Replikase-Polyproteins durch ribosomales *frame shift* sowie einzigartige enzymatische Aktivitäten der Replikase-Polyprotein-Produkte (Ziebuhr et al., 2000). Trotz der genannten gemeinsamen Charakteristika von Nidoviren unterscheiden sich die einzelnen Familien u.a. in der Genomgröße, in Anzahl und Größe der Strukturproteine im Viruspartikel sowie in der Morphologie ihrer Nukleokapside (Masters, 2006; Thiel und Weber, 2008).

Innerhalb der Unterfamilie *Coronavirinae* werden drei Genera (entsprechend den früheren „Gruppen“ 1, 2 und 3) unterschieden: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* und *Gammacoronavirus* (de Groot et al., 2012). Diese Einteilung beruht u.a. auf phylogenetischen Analysen, antigenetischen Eigenschaften, Position und Anzahl der akzessorischen Gene im 3'-Bereich des Genoms, Spaltung des S-Proteins sowie Wirtsspektrum (Stephensen et al., 1999; González et al., 2003; Narayanan et al., 2008; Pratelli, 2011). Ein viertes Genus, *Deltacoronavirus*, wurde vor kurzem von der *Coronavirus Study Group of the International Committee for Taxonomy of Viruses* vorgeschlagen.

Coronaviren (CoV) führen meist zu respiratorischen und/oder intestinalen Infektionen in Säugetieren und Vögeln (Dye und Siddell, 2005; Weiss und Navas-Martin, 2005). Viren des Genus *Alphacoronavirus* infizieren insbesondere Epithelzellen des Respirations- und/oder Gastrointestinaltrakts sowie Makrophagen (Tresnan et al., 1996; Pratelli, 2011). Ein typischer Vertreter der Alphacoronaviren ist das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte feline Coronavirus (FCoV). Weitere Mitglieder dieses Genus sind u.a. das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), das canine

Coronavirus (CCoV), das Virus der porcinen epidemischen Diarrhöe (*porcine epidemic diarrhoea virus*, PEDV) und die humanpathogenen Coronaviren HCoV-229E und HCoV-NL63. Das Genus *Betacoronavirus* beinhaltet neben dem als Modell besonders gut untersuchten murinen Hepatitis Virus (MHV) weitere tierpathogene Coronaviren wie das bovine Coronavirus (BCoV), das equine Coronavirus (ECoV) sowie die humanpathogenen Coronaviren HCoV-OC43, HCoV-HKU1 und das SARS-CoV. Alle bisher identifizierten Viren aus dem Genus *Gammacoronavirus* verursachen hauptsächlich Infektionen beim Geflügel (Masters, 2006); das am besten untersuchte Virus aus diesem Genus ist das wirtschaftlich bedeutsame Infektiöse Bronchitis Virus (IBV). 2008 wurde in einem toten Wal das Beluga Wal Coronavirus SW1 identifiziert, das phylogenetisch am nächsten mit dem Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) verwandt ist (Mihindukulasuriya et al., 2008). Seit 2009 wird es von dem *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) als neue Spezies in das Genus *Gammacoronavirus* eingeordnet. Die wichtigsten Spezies/Vertreter der Coronaviren sind in Tab. 1.1 aufgelistet.

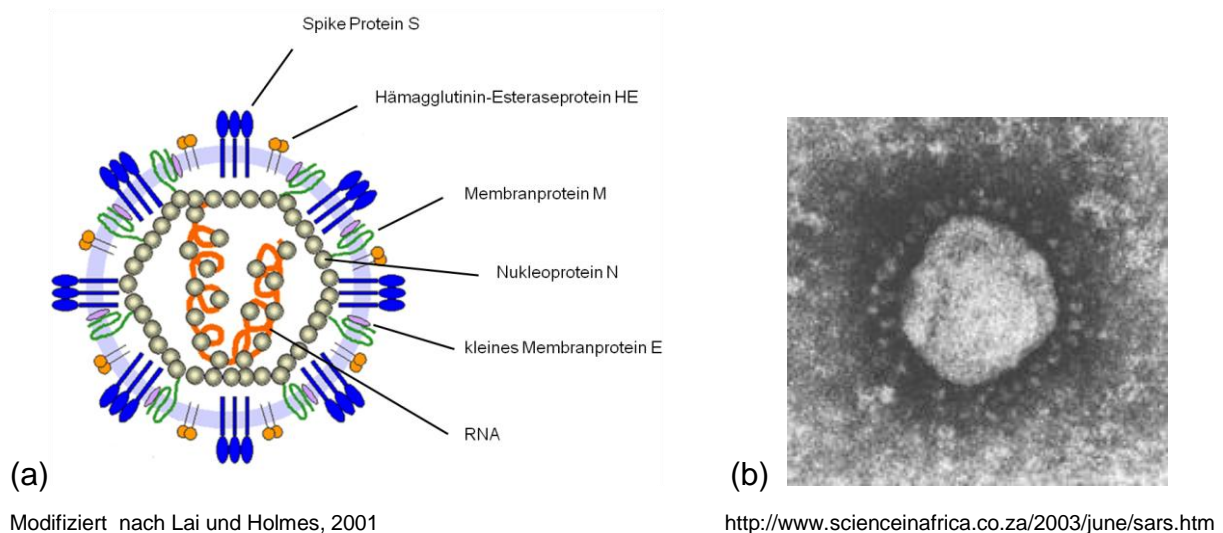
Tab. 1.1: Nomenklatur der Virusunterfamilie *Coronavirinae*

Genus	Spezies (kursiv)/ Vertreter	Abkürzung
<i>Alpha-coronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus-1</i> Felines Coronavirus Canines Coronavirus Transmissibles Gastroenteritis Virus Porzines Respiratorisches Coronavirus <i>Virus der porzinen epidemischen Diarrhöe</i> <i>Humanes Coronavirus-229E</i> <i>Humanes Coronavirus-NL63</i>	FCoV CCoV TGEV PRCoV PEDV HCoV-229E HCoV-NL63
<i>Beta-coronavirus</i>	<i>Betacoronavirus-1</i> Bovines Coronavirus Canines respiratorisches Coronavirus Equines Coronavirus Porzines hämagglutinierendes Enzephalomyelitis Virus Humanes Coronavirus OC43 <i>Murines Hepatitis Virus</i> <i>Humanes Coronavirus HKU1</i> <i>SARS coronavirus</i>	BCoV CrCoV ECoV HEV HCoV-OC43 MHV HCoV-HKU1 SARS-CoV
<i>Gamma-coronavirus</i>	<i>Aviäres Coronavirus</i> Infektiöse Bronchitis Virus Truthahn Coronavirus <i>Belugawal Coronavirus SW1</i>	IBV TCoV BWCoV SW1

Das neu vorgeschlagene Genus *Deltacoronavirus* umfasst die kürzlich identifizierten Spezies Bulbul Coronavirus HKU11, Trush Coronavirus und Munia Coronavirus. Keines der drei neuen Coronaviren wurde bis jetzt detailliert untersucht. Ähnlich wie die aviären Coronaviren im Genus *Gammacoronavirus* infizieren sie Vögel (Woo et al., 2009).

### 1.1.2 Morphologie

Coronavirale Partikel sind behüllt, oft unregelmäßig geformt und besitzen einen Durchmesser von 120-160 nm (Abb. 1.1). In ihrer Hülle tragen sie 17-20 nm lange Projektionen, die aus Trimeren von glykolysierten S-Proteinen bestehen (Delmas und Laude, 1990; Masters, 2006). Diese verleihen den Virionen im Elektronenmikroskop das typische Erscheinungsbild einer Sonnenkorona und haben zur Namensgebung „Corona“ geführt (Thiel und Weber, 2008). Das S-Protein ist ein Transmembranprotein mit einer Größe von ca. 180-220 kDa und besitzt zwei funktionelle Domänen S1 und S2, die für die Rezeptorbindung (S1) (Taguchi, 1995) bzw. für die Fusion mit der Membran der Zielzelle (S2) (Taguchi und Shimazaki, 2000) verantwortlich sind. Zudem stellt das S-Protein das dominante virale Oberflächenantigen dar, das neutralisierende Antikörper induziert (Cavanagh, 1995). In die Membran integriert sind neben dem S-Protein das M-Protein (25-30 kDa) und das E-Protein (10-12 kDa). Ausschließlich bei den meisten Vertretern der Betacoronaviren (nicht beim SARS-CoV) ist zusätzlich das Hämagglutinin-Esteraseprotein HE (60-65 kDa) (Wurzer et al., 2002; Mallick et al. 2009) zu finden, das ebenfalls in die Membran eingebettet ist und sowohl hämagglutinierende als auch rezeptorzerstörende (Esterase) Eigenschaften besitzt (Langereis et al., 2010). Ähnlich wie das S-Protein bilden die dimerisierten HE-Proteine 5-7 nm lange Projektionen und induzieren eine systemische und mukosale Immunantwort (Baca-Estrada et al., 1995). Im Inneren des Virions befindet sich das helikale Nukleokapsid, das aus dem Nukleoprotein N (43-50 kDa) und dem einzelsträngigen, nichtsegmentierten RNA-Genom besteht. Neben seiner Funktion als strukturelles Element beeinflusst das N-Protein die Transkription und Translation der viralen mRNAs sowie die Replikation (Baric et al., 1988; Schelle et al., 2005).



**Abb. 1.1: Morphologie eines Coronavirions**

(a) Schematische und (b) elektronenmikroskopische Darstellung der Virionenstruktur.

### 1.1.3 Genomorganisation

Coronaviren besitzen eine lineare einzelsträngige RNA in Plusstrangorientierung mit einer Größe von 27,3 kb – 31,4 kb und damit das größte Genom aller bekannten RNA-Viren (Gorbalenya et al., 2006; de Groot et al., 2012). Am 5'-Ende befindet sich eine Cap-Struktur und das 3'-Ende ist polyadenyliert (de Haan et al., 2003; Haijema et al., 2003). Die genomische RNA kann somit als mRNA fungieren und ist in isolierter Form infektiös (Lai und Cavanagh, 1997; Hurst et al., 2010). Diese Eigenschaften erlauben direkt nach der Infektion eine Translation der viralen RNA durch die zelluläre Maschinerie. Weiterhin befinden sich am 5'- und 3'-Ende der genomischen RNA nichttranslatierte Regionen (*untranslated regions*, UTRs), die mehrere hundert Nukleotide umfassen. Die UTRs enthalten RNA-Strukturen, sogenannte *cis*-aktive Elemente, die für die Replikation und Transkription erforderlich sind (Huang und Lai, 2000; Goebel et al., 2004; Brian und Baric, 2005). Die ersten 65-98 Nukleotide innerhalb der 5'-UTR werden als Leader-Sequenz bezeichnet; diese Sequenz befindet sich am 5'-Ende aller subgenomischen mRNAs (Lai und Holmes, 2001). Das coronavirale Genom enthält mehrere offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs). Zwei große, sich überlappende ORFs (1a und 1b) im 5'-terminalen Bereich umspannen etwa zwei Drittel des gesamten Genoms und kodieren gemeinsam für ein Polyprotein 1ab (pp1ab) von ca. 750 – 800 kDa. Das Translationsprodukt von ORF 1a ist ein 450-500 kDa großes Protein, das als

Polyprotein 1a (pp1a) bezeichnet wird (Hertzog et al., 2004). Eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters (*frame shift*) während der Translation durch die sogenannte „*slippery*“ Sequenz (UUUAAAC) sowie einen sekundärstrukturbedingten Pseudoknoten der RNA führt zum Überlesen eines Translationsstopcodons am Ende des Leserahmens 1a und ermöglicht die Proteinsynthese bis zum Ende des Leserahmens 1b (Masters, 2006). Die beiden Polyproteine beinhalten die erforderlichen Proteinfunktionen für die virale Replikation und Transkription (Thiel et al., 2001a). Die Leserahmen für die Synthese der Struktur- und akzessorischen Proteine befinden sich im 3'-Bereich des Genoms. In der Reihenfolge vom 5'- zum 3'-Ende kodieren sie für die Strukturproteine S, E, M und N. Die Anordnung dieser Gene im Genom ist innerhalb der Genera *Alpha*-, *Beta*- und *Gammacoronavirus* konserviert (Brian und Baric, 2005). Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich je nach Coronavirus unterschiedlich viele kleine Leserahmen, die für sog. akzessorische Proteine kodieren (Siddell, 1995). Über die Funktionen der meisten dieser Proteine ist wenig bekannt (Lai et al., 2007), bei einigen konnte gezeigt werden, dass sie als Strukturproteine fungieren (z.B. SARS-ORF 3a-Protein, HCoV-NL63-ORF 3-Protein) (Ito et al., 2005; Lu et al., 2006; Müller et al., 2010). Für die Virusreplikation in Zellkultur sind die akzessorischen Proteine nicht essenziell (Ontiveros et al., 2001; de Haan et al., 2002; Haijema et al., 2003; Marra et al., 2003; Ortego et al., 2003; Snijder et al., 2003; Haijema et al., 2004; Casais et al., 2005; Yount et al., 2005; Cavanagh et al., 2007).

#### 1.1.4 Der coronavirale Replikationszyklus

Die Virionen heften sich mit Hilfe des S-Proteins an den Rezeptor der Wirtszelle und setzen ihr Genom in das Zytoplasma der Zielzelle nach Fusion der Virushülle entweder mit der Plasmamembran (murines Hepatitis Virus Typ 2, MHV-2; SARS-Coronavirus, SARS-CoV) (Simmons et al., 2005; Qiu et al., 2006) und/oder mit der Membran eines endozytischen Vesikels frei (Feline Infektiöse Peritonitis Virus, FIPV; humanes Coronavirus-229E, HCoV-229E; Transmissible Gastroenteritis Virus, TGEV) (Hansen et al., 1998; Nomura et al., 2004; van Hamme et al., 2007). Die zellulären Rezeptoren für eine Reihe von Coronaviren sind bekannt. So interagieren CoV aus dem Genus *Alphacoronavirus*, u.a. TGEV, PRCoV, HCoV-229E, CCoV (Tresnan et al., 1996), PEDV (Li et al., 2007) sowie FCoV Serotyp II (Haijema et al.,

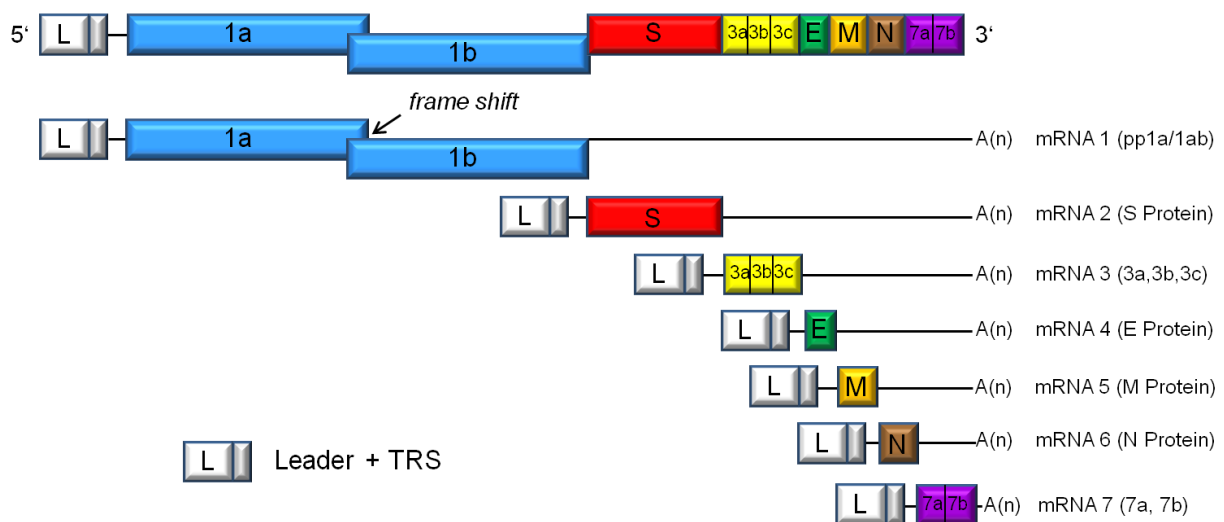
2007; Wentworth und Holmes, 2007) mit der Aminopeptidase N (CD13). *Feline dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin* (fDC-SIGN) ist ein möglicher Rezeptor für FCoV Serotyp I und ist zudem bei der Infektion durch Serotyp II FIPVs involviert (Regan et al., 2010; van Hamme et al., 2011). Für das Alphacoronavirus HCoV-NL63 und das Betacoronavirus SARS-CoV wurde *angiotensin converting enzyme* (ACE2) als Rezeptor nachgewiesen (Hofmann et al., 2005; Li et al., 2003; Berry et al., 2010; Imai et al., 2010). Ein weiteres Betacoronavirus, das murine Hepatitis Virus (MHV), verwendet das *murine carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a* (CEACAM1a) als Rezeptor (Bender et al., 2010; Hirai et al., 2010).

Nach Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma der infizierten Zelle dient die genomische RNA als Matrize für die Translation des Replikasegens durch die zelluläre Maschinerie (Ivanov et al., 2004). Dies führt zu der Entstehung der Polyproteine pp1a und, durch ein ribosomales *frame shift*, pp1ab, die einen kompletten viralen Replikationszyklus initiieren.

#### 1.1.4.1 Replikation und Transkription

Die Replikation der genomischen RNA erfordert die Synthese einer negativsträngigen Kopie des kompletten Genoms, die als Ausgangsmaterial zur Herstellung von positivsträngigen Kopien der genomischen RNA dient. Im Gegensatz zu den meisten Nichtstrukturproteinen, die durch die genomische RNA exprimiert werden, werden die coronaviralen Strukturproteine und die akzessorischen Proteine durch subgenomische RNA-Moleküle exprimiert, die als mRNA fungieren (Spaan et al., 1983). Jede subgenomische mRNA ist 3'-koterminale mit der genomischen RNA und besitzt zudem eine kurze 5'-terminale Leader-Sequenz, die identisch mit dem 5'-Ende des Genoms ist (Abb. 1.2) (Spaan et al., 1983; Lai und Holmes, 2001; Pasternak et al., 2001). Diese mRNAs werden durch einen einzigartigen Mechanismus produziert, der eine diskontinuierliche Transkription während der Negativstrang-RNA-Synthese beinhaltet (Sawicki und Sawicki, 1995; Pasternak et al., 2001; Zuniga et al., 2004). Hierbei spielen virusspezifische konservierte Sequenzmotive (Transkription-regulierende Sequenzen, TRSs) eine entscheidende Rolle; diese werden von der RNA-abhängigen RNA-Polymerase

erkannt und befinden sich *upstream* vor jedem subgenomischen ORF (Body-TRS) sowie am 3'-Ende der Leader-Sequenz (Leader-TRS) (Lai und Holmes, 2001).



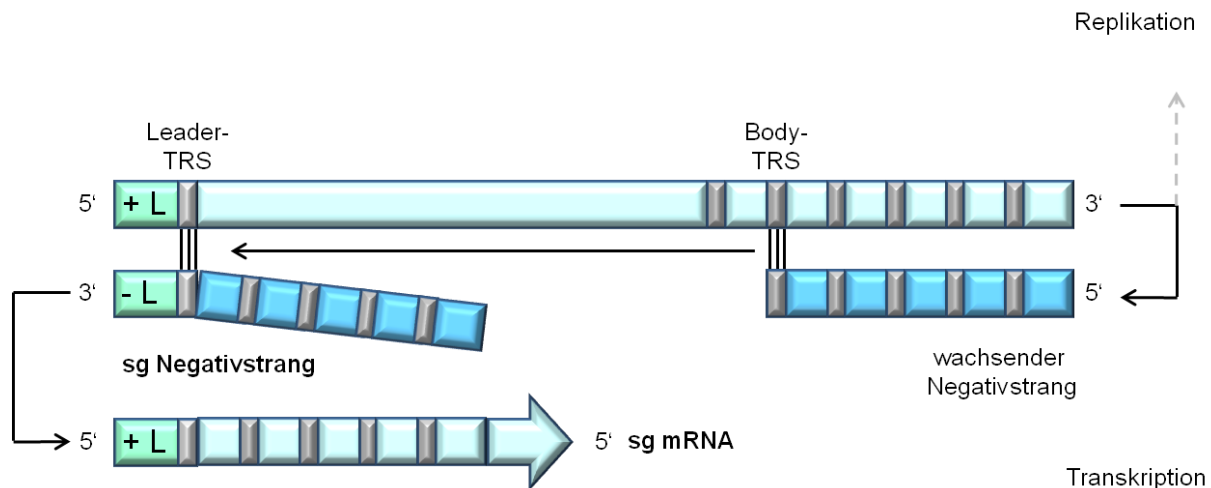
Modifiziert nach Pasternak et al., 2006

**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Genomorganisation und Expression von feline Coronaviren (FCoVs)**

Dargestellt sind die FCoV ORFs (farbige Boxen), die TRS Elemente, die genomische RNA und die subgenomischen mRNAs. Die weißen Boxen zeigen die Leader-Sequenz, die am 5'-Ende jeder viralen mRNA lokalisiert ist. Auf den ribosomalen *frame shift* wird in der genomischen mRNA 1 hingewiesen. Der translatierte Bereich jeder mRNA wird durch eine farbige Box gekennzeichnet, während nicht translatierte Bereiche durch eine schwarze Linie dargestellt sind. Die subgenomischen RNA-Moleküle, mit Ausnahme von mRNA 7, sind funktionell monocistronisch, aber strukturell polycistronisch.

Die Synthese der Negativstrang-RNAs beginnt am 3'-Ende der genomischen Positivstrang-RNA und wird in der Nähe der Body-TRS-Elemente gestoppt. Anschließend fusioniert die jeweilige 3'-Body-TRS an die genomische 5'-Leader-TRS. Der subgenomische Negativstrang wird komplementär zu der 5'-Leader-Sequenz verlängert und hiermit die subgenomische Negativstrang-Synthese abgeschlossen. Ausgehend von den Negativstrang-sgRNAs werden anschließend subgenomische mRNAs transkribiert, die als Matrize für die Expression von Strukturproteinen und akzessorischen Proteinen dienen (Abb. 1.3) (Sawicki und Sawicky, 1995).





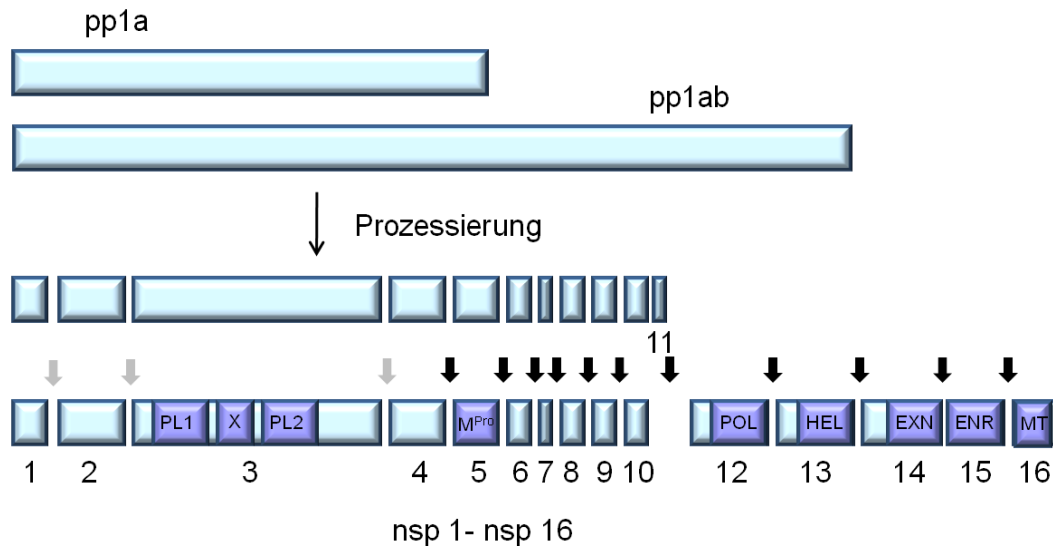
Modifiziert nach Pasternak et al., 2006.

**Abb. 1.3: Modell für die diskontinuierliche Transkription während der Negativstrang-RNA-Synthese.** Die Synthese der Negativstrang-RNAs beginnt am 3'-Ende der genomischen Positivstrang-RNA. Die Body-TRSs in dem Genom agieren als Attenuierungssignal für die Minusstrang-RNA-Synthese; die 3'-Body-TRS des gebildeten Negativstranges fusioniert über Basenpaarbindung an die 5'-Leader-TRS. Der sg Negativstrang wird komplementär zur Leader-Sequenz verlängert, die sg Negativstrang-Synthese abgeschlossen, und der gebildete sg Negativstrang als Template für die Transkription der sg mRNAs verwendet.

#### 1.1.4.2 Proteolytische Prozessierung

Die viralen Polyproteine werden ko- und posttranslational in 16 Nichtstrukturproteine (nsp) prozessiert, die zusammen mit zellulären Proteinen den coronaviralen Replikations/Transkriptions-Komplex bilden. Sowohl die Replikation des viralen Genoms als auch die Transkription subgenomischer mRNAs werden durch die Aktivität dieses Komplexes reguliert (Thiel et al., 2001a; Hertzog et al., 2004; Sutton et al., 2004; Sawicki et al., 2005). Die Prozessierung erfolgt durch viruskodierte Proteasen; während die N-terminalen Regionen durch ein oder zwei papainähnliche Proteasen (PL1 und PL2) an drei Stellen prozessiert werden (Thiel et al., 2003a), werden die in der Mitte gelegenen sowie die C-terminalen Regionen an elf konservierten Stellen durch eine 3C-ähnliche Hauptprotease ( $M^{Pro}$ ) geschnitten (Ziebuhr et al., 2000; Putics et al., 2005) (Abb. 1.4). Neben den durch ORF 1a kodierten Proteasen werden weitere Enzyme durch ORF 1b kodiert, nämlich eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, eine RNA-Helikase (Gorbalenya et al, 1989), eine Exoribonuklease, eine Endoribonuklease, eine ADP-Ribose-1-Monophosphatase sowie eine S-Adenosyl-methioninabhängige Ribose-2'-O-Methyltransferase (Snijder

et al., 2003). Neben den aufgeführten Enzymen kodiert der ORF 1a für neun weitere Proteine, über deren Struktur und Funktion wenig bekannt ist (Sutton et al., 2004).



Modifiziert nach Sawicki et al., 2005

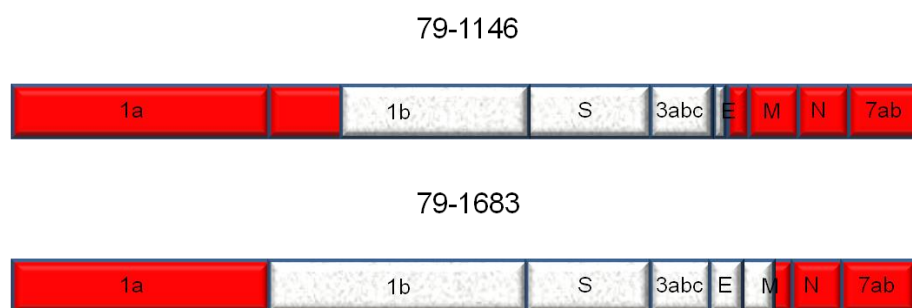
#### Abb. 1.4: Proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab

Gezeigt ist die proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab durch virale Proteasen in 16 Nichtstrukturproteine (nsp). Dabei werden die Nichtstrukturproteine nsp 1 - nsp 11 von ORF 1a und nsp 12 - nsp 16 von ORF 1b kodiert (Ziebuhr et al., 2000). Die hellgrauen Pfeile weisen auf die drei Schnittstellen für die papainähnlichen Proteasen und die schwarzen Pfeile auf die elf konservierten Prozessierungsstellen für die 3C-ähnliche Hauptprotease hin. Bestätigte und putative enzymatische Domänen in den Nichtstrukturproteinen sind angegeben und lilafarben markiert: PL1, papainähnliche Protease 1; PL2, papainähnliche Protease 2; X, ADP-Ribose-1-Monophosphatase; M<sup>Pro</sup>, 3C-ähnliche Hauptprotease; POL, RNA-abhängige RNA-Polymerase; HEL, RNA-Helikase; EXN, Exoribonuklease; ENR, Endoribonuklease; MT, S-adenosylmethioninabhängige Ribose-2'-O-Methyltransferase.

## 1.2 Feline Coronaviren

Feline Coronaviren (FCoV) sind weltweit verbreitet und verursachen Infektionen bei domestizierten und wildlebenden Feliden; 80-90% der Katzen in Zuchten oder Mehrkatzenhaushalten und 10-50% der Katzen in Einzelhaushalten sind seropositiv (Pedersen et al., 1981; Addie und Jarrett, 1992). Bei einem Teil der infizierten Katzen tritt eine persistierende Infektion auf; das Virus wird kontinuierlich über Monate bis Jahre oder lebenslang ausgeschieden. Die meisten Katzen werden transient infiziert;

nach einem Zeitraum von Monaten hören sie auf das Virus auszuschcheiden, werden wieder seronegativ und können erneut re-infiziert werden (Herrewegh et al., 1997; Addie und Jarrett, 2001). Basierend auf serologischen Studien lassen sich FCoV in zwei Serotypen einteilen, Typ I und Typ II, die mit Typ-spezifischen feline Seren (Pedersen et al., 1984) oder mit monoklonalen Antikörpern gegen das S-Protein (Hohdatsu et al., 1991) in Virusneutralisationstest unterschieden werden können. Im Gegensatz zu Serotyp I FCoV zeigen Serotyp II FCoVs eine starke serologische Kreuzreaktion mit CCoV. Die Kreuzreaktion ist darauf zurückzuführen, dass die S-Gene von Serotyp II FCoVs näher mit CCoVs (Nukleotidsequenzidentität von 91%) als mit Serotyp I FCoVs (Nukleotidsequenzidentität von 46%) verwandt sind (Wesseling et al., 1994; Motokawa et al., 1995). Die Ursache hierfür ist, dass Serotyp II FCoVs durch homologe RNA-Rekombination zwischen Serotyp I FCoV und CCoV entstanden sind. Das daraus resultierende FCoV-Genom enthielt das S-Gen und flankierende Bereiche von einem CCoV-Genom. Sequenzanalysen der Serotyp II Laborstämme 79-1146 und 79-1683 zeigen, dass die Rekombination-sites im ORF 1 und in dem E- bzw. M-Gen liegen (Motokawa et al., 1996; Herrewegh et al., 1998; Vennema, 1999) (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Rekombinationsschema zur Entstehung der Serotyp II FCoV Stämme 79-1146 und 79-1683.** Die roten Blöcke zeigen Teile der Typ II FCoV Genome, die ursprünglich von einem Serotyp I FCoV stammen. Die grauen Blöcke präsentieren die CCoV-Sequenzen. Matrizenwechsel fanden im ORF 1 und in dem E- bzw. M-Gen statt (Motokawa et al., 1996; Herrewegh et al., 1998).

Serotyp I FCoVs sind im Feld weiter verbreitet als Serotyp II FCoVs und weltweit für 80-90% der FCoV-Infektionen verantwortlich (Hohdatsu et al., 1992; Addie et al., 2003; Lin et al., 2008). Serotyp II FCoVs wurden in Europa und in den USA kaum

gefunden; in Japan hingegen machen sie 10-30% der Infektionen aus (Rottier, 1999; Addie et al., 2003).

Beide Serotypen bestehen aus zwei Biotypen; das Feline Enterale CoV (FECV), das meist zu klinisch inapparenten Verläufen oder zu milden gastrointestinalen Erkrankungen führt, und das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV). Letzteres tritt sporadisch auf und verursacht eine letale Krankheit, die Feline infektiöse Peritonitis (FIP) (Rottier, 1999; Dye und Siddell, 2005; Takano et al., 2007; Pedersen et al., 2008; Sharif et al., 2010). FECV wird hauptsächlich fäkal-oral durch virushaltige Ex- und Sekrete, vor allem durch Kot, übertragen (Kipar et al., 2006; Garner et al., 2008; Pedersen, 2008). Junge Katzen infizieren sich im Alter von wenigen Wochen nach Verlust der maternalen Immunität bei der Mutter oder bei anderen Coronavirus-ausscheidenden Katzen (Addie und Jarrett, 1992; Addie et al., 2009). Während FECV horizontal übertragen wird (Poland et al., 1996), spielt dieser Übertragungsweg bei der Entstehung von FIP wahrscheinlich nur eine geringe Rolle. Nach der allgemein akzeptierten *internal mutation theory* entsteht das virulente FIPV in einer Katze de novo durch Mutation(en) aus dem schwach virulenten FECV und löst in der Folge FIP aus (Pedersen et al., 1984; Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Bestärkt wird diese Theorie durch phylogenetische Vergleiche, die gezeigt haben, dass FIPV/FECV aus demselben Bestand bis zu 98% genetische Identität zeigten und zu FIPV- und FECV-Stämmen aus anderen geographischen Regionen eine deutlich geringere Homologie aufwiesen (Vennema et al., 1998). Bisher wurde kein einheitliches Muster der Mutationen gefunden, die für den Biotypenwechsel verantwortlich sind. Es wurden Veränderungen im S-Gen, im M-Gen und in den akzessorischen Genen 3c, 7a und 7b mit der Entstehung von FIP in Zusammenhang gebracht (Vennema et al., 1998; Kennedy et al., 2001; Rottier et al., 2005; Brown et al., 2009; Pedersen et al., 2009; Chang et al., 2010; Chang et al., 2012). Alternativ zu der *internal mutation theory* wurde 2009 von Brown et al. die *circulating virulent/avirulent theory* vorgeschlagen. Demnach zirkulieren harmlose und virulente FCoV-Stämme in der Katzenpopulation und empfängliche Katzen, die dem virulenten Stamm ausgesetzt sind, erkranken an FIP. Diese Theorie basiert auf phylogenetischen Analysen von viralen Gensequenzen (Polymerase, S, M, 7b) von FCoV-infizierten gesunden Katzen und Katzen mit FIP. Phylogenetische Analysen zeigten, dass sich Sequenzen der Gene M und 7b in Viren, die von gesunden Katzen stammten, von denen unterschieden, die von erkrankten Katzen stammten. Die

Analysen lassen auf die Co-Existenz von beiden Biotypen in Katzen schließen. Diese Theorie ist allerdings nicht allgemein anerkannt.

Die Unterschiede in der Virulenz gehen mit einem veränderten Tropismus einher. Während FECV bevorzugt lokal in Epithelzellen des Darms repliziert, kann sich FIPV zudem effizient in Monozyten vermehren und sich so systemisch ausbreiten (Weiss und Scott, 1981; Dewerchin et al., 2005). Für die Pathogenese von FIP scheint die massive Replikation in Monozyten von zentraler Bedeutung zu sein (Pedersen, 1976; Stoddart und Scott, 1989). Nachdem die infizierten Monozyten in das perivaskuläre Gewebe eingedrungen sind, setzen diese und umliegende Zellen zahlreiche Entzündungsmediatoren wie Zytokine (Goitsuka et al., 1990, Hasegawa und Hasegawa, 1991), Prostaglandine und Leukotriene (Weiss et al., 1988) frei. Diese Produkte führen zur Induktion von vaskulären Permeabilitätsveränderungen und begünstigen die chemotaktische Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten. Diese setzen zusätzlich Mediatoren und zytotoxische Substanzen frei und die Monozyten dienen zugleich als neue Zielzellen von FIPV. Letztendlich kommt es zu Vaskulitis und Granulombildung (Weiss et al., 1988; Dewerchin et al., 2005; Kipar et al., 2005).

### 1.3 FIP

Die Feline Infektiöse Peritonitis ist eine tödlich verlaufende Infektionskrankheit bei Katzen, die durch ein Coronavirus hervorgerufen wird (Wolfe und Griesemer, 1966). Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung bereits 1963 von Holzworth (Holzworth, 1963). Im Jahr 1968 wurde die Virusätiologie nachgewiesen (Zook et al., 1968) und im Jahr 1976 ein Coronavirus als kausatives Agens identifiziert (Pedersen, 1976). Die erste Virusisolierung in Zellkultur gelang Hoshino und Scott (1978) sowie O'Reilly et al. (1979).

Die FIP ist eine der wichtigsten Infektionskrankheiten und eine der häufigsten Todesursachen bei Katzen. Meist sind Katzen im Alter von 6 Monaten bis 2 Jahren von FIP betroffen. Grundsätzlich kann jede FCoV-Infektion zum Ausbruch von FIP führen, aber die tödliche Krankheit tritt nur bei etwa 5-12% der infizierten Katzen auf (Addie und Jarrett, 1992; Haijema et al., 2004). Das klinische Bild der FIP ist variabel und von den betroffenen Organsystemen abhängig. Es wird zwischen feuchter und trockener Form unterschieden. Die feuchte Form ist durch eine Vaskulitis

gekennzeichnet, die Ergüsse (proteinreiche Flüssigkeit aus den Blutgefäßen) in der Bauch- und/oder Brusthöhle zur Folge hat. Bei der trockenen FIP treten granulomatöse Veränderungen in inneren Organen, den Augen und im Zentralen Nervensystem auf. Im Endstadium der Krankheit kann die trockene FIP aufgrund des Zusammenbruchs des Immunsystems in die feuchte Form übergehen (Sharif et al., 2010). Allgemeinbefinden und Appetit können gestört sein. Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Apathie, Dehydratation und Anämie treten sowohl bei der feuchten als auch bei der trockenen Form auf (Addie et al., 2009).

Die FIP kann bislang nicht therapiert werden. Impfstrategien gegen FIPV basierend auf inaktivierten FCoV, verschiedenen Lebendviren (z.B. FECV, schwach virulentes FIPV, subletale Dosis von virulentem FIPV, attenuiertes FIPV durch wiederholte Vermehrung in Zellkultur) oder nah verwandten Coronaviren waren erfolglos (de Groot und Horzinek, 1995). Rekombinante Vaccinia Viren, die die FCoV-Strukturgene S (Vennema et al., 1990), M und N (Vennema et al., 1991) exprimieren, wurden als Vektoren eingesetzt, um in der Katze insbesondere Virus-neutralisierende Antikörper zu induzieren. Die Ansätze boten entweder keinen Schutz gegen FIPV oder der Schutz war nicht signifikant oder die Impfung beschleunigte den Krankheitsverlauf. Immunisierte Katzen, die Antikörper gegen das S-Protein bildeten, erkrankten nach einer FIPV-Infektion schneller an FIP als nichtimmunisierte Katzen (Vennema et al., 1990). Die Antikörper-abhängige Verstärkung (*antibody-dependent enhancement*, ADE) der FCoV-Infektion durch Antikörper gegen das FCoV S-Protein wurde bereits mehrfach bestätigt (Vennema et al., 1991; Corapi et al., 1992; de Groot und Horzinek, 1995; Hohdatsu et al., 1997; Takano et al., 2008).

Der einzige Impfstoff, den es zurzeit zum Schutz vor FIP gibt (Primucell® von der Firma Pfizer), basiert auf einer temperatursensitiven FCoV-Mutante des Serotyp II Stammes DF2 (Gerber et al., 1990, Christianson et al., 1990). Er wird intranasal appliziert und soll eine lokale Immunität im Bereich der Schleimhäute induzieren. Eine Vakzinierung ist vermutlich nur vor einer Infektion von Katzen mit FCoV erfolgversprechend. Unabhängig davon ist die Wirksamkeit des Impfstoffes umstritten.

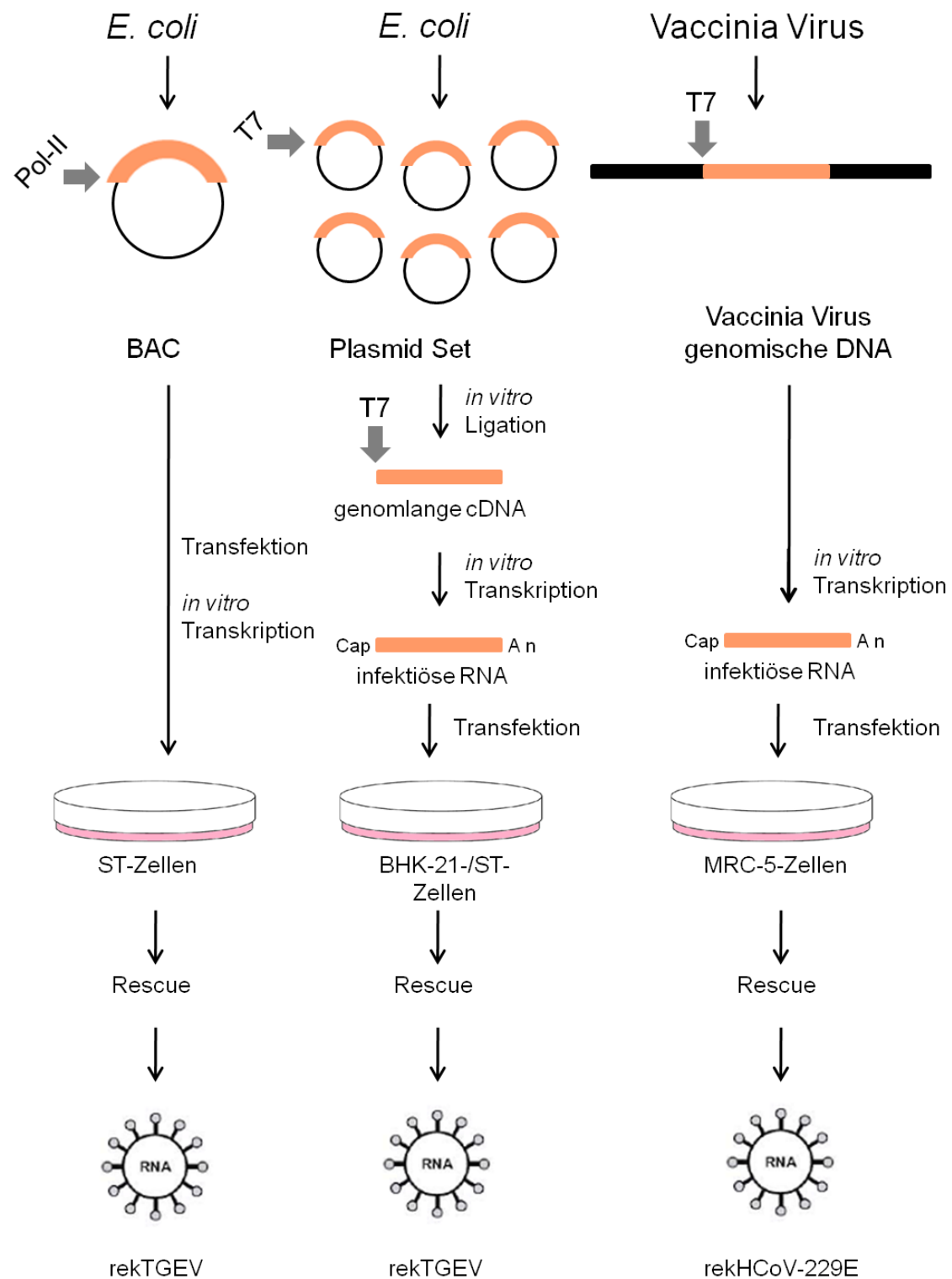
## 1.4 Reverse Genetik mit Coronaviren

Die reverse Genetik erlaubt die genetische Manipulation von RNA-Viren auf cDNA-Ebene und leistet somit einen sehr wichtigen Beitrag zur Erforschung und Aufklärung bestimmter Aspekte von Viren und den von ihnen verursachten Krankheiten. Die Größe des coronaviralen Genoms und die Instabilität spezifischer cDNA-Sequenzen in bakteriellen Klonierungssystemen sind dafür verantwortlich, dass bei der Herstellung von rekombinanten Coronaviren nicht auf traditionelle revers-genetische Techniken zurückgegriffen werden konnte. Revers-genetische Systeme für Coronaviren basieren vielmehr auf nicht-traditionellen Methoden (Thiel, 2007). Das erste revers-genetische System für Coronaviren wurde Anfang der 1990er Jahre von Masters und Kollegen beschrieben und beruht auf einer Methode, die als *“targeted RNA recombination”* bezeichnet wurde (Koetzner et al., 1992; Masters, 1999; Masters und Rottier, 2005). Die Methode eignet sich, um die 3'-terminale Region des coronaviralen Genoms, einschließlich der Gene S, E, M, N, der akzessorischen Gene sowie die 3'-UTR, zu manipulieren. Das System basiert auf Rekombination zwischen homologen Bereichen einer synthetischen Donor-RNA und der viralen RNA. Es werden Fragmente des Genoms mit den erwünschten Modifikationen als cDNA hergestellt, kloniert und *in vitro* transkribiert. Die synthetische Donor-RNA wird in Zellen transfiziert, die zuvor mit dem Ausgangsvirus infiziert wurden. Während der Replikation der viralen RNA findet Rekombination zwischen den homologen Bereichen statt. Die neben dem Ausgangsvirus entstehenden rekombinanten Viren werden auf eine hinzugewonnene Eigenschaft selektiert.

Die früheste Form von *“targeted RNA recombination”* verwendete als Ausgangsvirus ein temperatursensitives murines Hepatitis Virus (MHV). Die Temperatursensitivität ist auf eine 29 Aminosäuren lange Deletion im N-Gen zurückzuführen. Die gewünschte Rekombination mit der Donor-RNA führte zu einem Austausch des N-Gens durch ein intaktes N-Gen und einen 3'-terminal veränderten Bereich. Die Selektion der rekombinanten Viren erfolgte bei permissiver Temperatur (Koetzner et al. 1992; Peng et al., 1995). Ende der 1990er Jahre etablierten die Arbeitsgruppen von Masters und Rottier eine modifizierte Methode, die auf der Erzeugung rekombinanter MHV mit verändertem Speziestropismus basierte (Kuo et al., 2000; Masters and Rottier, 2005). Durch Rekombination mit der Donor-RNA wurden chimäre Viren (fMHV) erzeugt, die anstatt des kompletten MHV-S-Gens die entsprechende Ektodomäne des S-Gens von einem felineen Coronavirus (FCoV)

enthielten. Die entstandenen Chimären konnten unter Einsatz von Katzenzellen selektiert werden, während das Ausgangsvirus nur in Mauszellen replizieren konnte. “*Targeted RNA recombination*” basierend auf Speziestropismuswechsel wurde auch für das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV) (Haijema et al., 2003) und für das Virus der transmissiblen Gastroenteritis (Sanchez et al., 1999) etabliert. Wie bereits erwähnt, ist mit dem System “*targeted RNA recombination*” nur die Manipulation des 3′-terminalen Drittels des Genoms möglich. Für die Modifikation der Replikasegene sowie der 5′-UTR wurden Systeme entwickelt, die auf genomlangen cDNA-Klonen basieren (Abb. 1.6). Die einzelnen Ansätze verwenden jeweils eine andere Strategie, um die Stabilitätsprobleme der coronaviralen cDNA zu überwinden.





Modifiziert nach Thiel, 2007.

**Abb. 1.6: Strategien für die Herstellung rekombinanter Coronaviren basierend auf genomlangen cDNA Klonen**

Schematische Darstellung der Strategien zur Erzeugung rekombinanter Coronaviren. Hierbei wurde eine komplette coronavirale cDNA in *bacterial artificial chromosome* (BAC) integriert (links) (Almazan et al., 2000), durch *in vitro* Ligation hergestellt (Mitte) (Yount et al., 2000) oder in ein Vaccinia Virus Genom eingeführt (rechts) (Thiel et al., 2001b).

Im Jahr 2000 stellten Enjuanes und Kollegen das erste cDNA-basierte revers-genetische System für Coronaviren vor (Almazan et al., 2000). Eine genomlange cDNA-Kopie des TGEV wurde in ein *bacterial artificial chromosome* (BAC) kloniert und in *swine testis* (ST)-Zellen transfiziert (Abb. 1.6 links). Die Synthese der viralen RNA erfolgte *in vivo* im Zellkern durch die zelluläre RNA-Polymerase II über einen Cytomegalovirus (CMV) Promotor. Die entstandene genomlange RNA wurde nach Spleißen ins Zytoplasma transportiert und der coronavirale Replikationszyklus gestartet. Es entstanden rekombinante TGEV in den Zellen. Um Instabilität zu vermeiden, wurde ein 133 nt langes Intron in zwei toxische Regionen des TGEV-Genoms eingefügt, das anschließend beim Spleißen entfernt wurde (Gonzales et al., 2003). Mit dem BAC-System gelang die Herstellung von weiteren rekombinanten Coronaviren wie SARS-CoV (Almazan et al., 2006) und HCoV-OC43 (St-Jean et al., 2006).

Eine weitere Methode, zuerst beschrieben von Baric und Kollegen, basiert auf der Herstellung genomlanger TGEV-cDNA durch *in vitro* Ligation unter Verwendung von sechs das Genom abdeckenden cDNA-Fragmenten (Abb. 1.6 Mitte) (Yount et al., 2000). Nach *in vitro* Transkription der genomlangen cDNA erfolgte die Transfektion der RNA in BHK-21-/ST-Zellen. Dieser Ansatz erlaubte die Herstellung von rekombinanten MHV (Yount et al., 2002), SARS-CoV (Yount et al., 2003), IBV (Youn et al., 2005) und HCoV-NL63 (Donaldson et al., 2008).

Eine Alternative zu der Klonierung von cDNA in bakteriellen Systemen wurde von Siddell und Kollegen beschrieben. Genomlange HCoV-229E-cDNA wurde in ein Vaccinia Virus Genom eingefügt (Abb. 1.6 rechts) (Thiel et al., 2001b). Das Vaccinia Virus dient als eukaryontischer Vektor und weist keine Instabilität auf. Vaccinia Virus DNA wurde isoliert, die coronavirale cDNA *in vitro* transkribiert und die RNA in *human fetal lung fibroblast* (MRC-5)-Zellen transfiziert. Mit dieser Strategie und einer für das Virus geeigneten Zelllinie wurden auch erfolgreich rekombinante IBV (Casais et al., 2001), MHV (Coley et al., 2005) und FCoV Serotyp I (Tekes et al., 2008a) hergestellt.

Den drei Strategien ist gemein, dass die Ausbeute von rekombinanten Coronaviren durch zusätzliche Expression des jeweils homologen N-Proteins deutlich verbessert wird (Almazan et al., 2004; Schelle et al., 2005; Thiel et al., 2001b; Yount et al., 2002). Die Liste der Coronaviren, die nun mit Hilfe der reversen Genetik analysiert werden können, wird kontinuierlich länger. Revers-genetische Analysen dieser Viren

haben zu unserem Verständnis von Virionstruktur, RNA-Replikation und Transkription sowie Pathogenese beigetragen (Masters und Rottier, 2005). Mit diesem Wissen und der Möglichkeit der gezielten genetischen Manipulation des gesamten coronaviralen Genoms ist auch der Weg für die Entwicklung von neuen coronaviralen Vektoren und Vakzinen geebnet. Coronaviren, die Reportergene und andere Fremdgene enthalten, wurden bereits erfolgreich hergestellt (Fischer et al., 1997; Curtis et al., 2002; Sola et al., 2003; Thiel et al., 2003b; de Haan et al., 2005; Tekes et al., 2008a)

### 1.5 Coronaviren als Vektor

Die Entwicklung von effizienten revers-genetischen Systemen für Coronaviren ermöglicht auch die Anwendung dieser Viren als Vektoren, z.B. für Herstellung und Einsatz von Impfstoffen und für therapeutische Zwecke. Coronaviren besitzen mehrere Vorteile, die sie als Vektoren attraktiv erscheinen lassen. Zunächst können durch Deletion der gruppenspezifischen, akzessorischen Gene virulente Coronaviren in attenuierte Viren überführt werden; dies wurde bereits für MHV (de Haan et al., 2002), TGEV (Ortego et al., 2003) und FIPV (Haijema et al., 2004) demonstriert. Aufgrund der Größe des Virusgenoms und den nach Deletionen der akzesorischen Gene verfügbaren Platz können recht große Fremdgene eingefügt werden (Masters, 1999; Enjuanes et al., 2000). Der einzigartige Transkriptionsmechanismus von Coronaviren erlaubt die Expression von Fremdgenen, indem die Insertion des Fremdgens in das Genom zusammen mit der coronaviralen TRS erfolgt. Desweiteren kann durch die Veränderung des S-Proteins der Spezies- und Zelltropismus verändert werden (Kuo et al., 2000; Sanchez et al., 1999; de Haan et al., 2005). Zudem sind Coronaviren einzelsträngige RNA-Viren, die im Cytoplasma ohne eine DNA-Zwischenstufe replizieren; eine Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom ist weitgehend ausgeschlossen (Lai und Cavanagh, 1997; Enjuanes et al., 2001).

Der erste Versuch, Coronaviren für heterologe Genexpression zu verwenden, erfolgte mit MHV *defective* RNA (D-RNA), die das Reportergen Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) exprimierte (Lin und Lai, 1993). Mit Hilfe des MHV-Systems wurden zudem die heterologen Gene für Hämagglutinin-Esteraseprotein (HE) (Liao und Lai, 1995), für Interferon- $\gamma$  (Lai et al., 1997; Zhang et al., 1997) und für

grünfluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Auch D-RNAs von anderen Coronaviren wurden für die Expression von heterologen Genen eingesetzt. Die D-RNA von IBV als RNA-Vektor wurde für die Expression der Reportergene CAT und Luciferase (LUC) (Stirrup et al., 2000) sowie für die Expression von Interferon- $\gamma$  (Hackney et al., 2003) verwendet. Der Einsatz einer TGEV-cDNA, die die TGEV D-RNA kodiert, erlaubte die Expression von  $\beta$ -Glucoronidase (GUS) (Izeta et al., 1999; Alonso et al., 2002) und Luciferase (Alonso et al., 2002). Basierend auf einer genomlangen cDNA von verschiedenen Coronaviren, z.B. TGEV, MHV und FCoV, wurde das GFP-Gen stabil exprimiert (Fischer et al., 1997; Curtis et al., 2002; Sola et al., 2003; Tekes et al., 2008a). MHV und FCoV dienten zudem als Vektor für die Expression von Renilla (RL)- und LUC-Gen (de Haan et al., 2005). Thiel et al. (2003b) entwickelten einen multigenen RNA-Vektor, der den 5'- und 3'-terminalen Bereich sowie das Replikasegen des humanen Coronavirus 229E enthielt und für die Expression der drei Reportergene CAT, LUC und GFP sorgte (Thiel et al., 2003b).

Eine große und wachsende Anzahl von Coronavirus-abgeleiteten Expressionssystemen kann inzwischen sehr gut als Vektor für die heterologe Genexpression verwendet werden. Dabei werden Stabilität und Expressionslevel des heterologen Gens vom coronaviralen Hintergrund, vom jeweiligen Fremdgen und von der Position im Genom beeinflusst (de Haan et al., 2003; de Haan et al., 2005). So war die Expression der Gene von MHV D-RNAs nicht stabil (Izeta et al., 1999). Die Expression des CAT-Gens konnte nur bis zur zweiten Passage ( $P_2$ ), die des HE-Gens bis zur dritten Passage ( $P_3$ ) und die von Interferon- $\gamma$  bis zur vierten Passage ( $P_4$ ) detektiert werden (Lin und Lai, 1993; Liao et al., 1995; Zhang et al., 1997). Auch die Expression von GUS im TGEV D-RNA-System war instabil. Im IBV-System wirkte die Expression von CAT stabiler als die von LUC, jedoch sank die Expression von CAT bereits nach der sechsten Passage ( $P_6$ ) (Stirrups et al., 2000). Izeta et al. (1999) vermuteten, dass die Anwesenheit von nicht-coronaviralen Sequenzen in den D-RNAs einen negativen Einfluss auf die Stabilität hat (Izeta et al., 1999).

Im Hinblick auf Vektoren, die auf einer genomlangen cDNA basieren, zeigte das RL-Gen eine höhere Stabilität als das LUC-Gen; letzteres war in FCoV stabiler als in MHV (de Haan et al., 2005). Die Expression des LUC-Gens in MHV wurde stärker, je näher das heterologe Gen am 3'-terminalen Ende des Genoms lag (de Haan et al., 2003). De Haan et al. (2005) zeigten, dass eine höhere Stabilität von Fremdgenen erreicht wurde, wenn sie akzessorische Gene ersetzen. In vielen Coronaviren zeigte

das Gen GFP eine hohe Stabilität. In TGEV wurde GFP auch nach 20 Passagen ( $P_{20}$ ) stabil und effizient exprimiert, wenn das Fremdgen in den ORF 3 eingefügt wurde. Eine Insertion zwischen ORF 6 (Gen N) und ORF 7 (Gene 7ab) führte zu Instabilität und zu Deletionen im Bereich des Reportergens (Sola et al., 2003).

Coronaviren konnten bereits erfolgreich als Vektoren für Impfstoffe eingesetzt werden. Cervantes-Barragan et al. (2010) generierten attenuiertes MHV, das die Epitope von zytotoxischen T-Lymphozyten in Kombination mit dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) exprimiert. Neben dem Glykoprotein<sub>33-41</sub> des Lymphozytären Choriomeningitis Virus diente das Melan-A Analog-Peptid<sub>26-35</sub> von humanem Melanom als Epitop. Diese Coronavirus-basierten Vektoren erzeugten eine schützende Immunantwort gegen virale Erreger und induzieren eine prophylaktische und therapeutische Tumor-Immunantwort.

## 1.6 Zielsetzung

Die weltweit verbreiteten feline Coronaviren rufen Infektionen bei wildlebenden und domestizierten Feliden hervor. Auf der Basis von Virulenz lassen sich zwei Bio- oder Pathotypen unterscheiden, das Feline Enterale Coronavirus (FECV), das zu klinisch inapparenten bis milden Verläufen führt, und das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV), das effizient in Monozyten/Makrophagen repliziert und zu einer letalen Krankheit führt, die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP). Es wird angenommen, dass FIPV im persistent infizierten Tier durch Mutation(en) aus FECV hervorgeht. Bis jetzt konnte noch nicht geklärt werden, welche genomische Veränderung für den unterschiedlichen zellulären Tropismus verantwortlich ist. Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war, unter Verwendung eines etablierten revers-genetischen Systems mit einem nicht virulenten FCoV, die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FIPV 79-1146 um die Feline Infektiöse Peritonitis zu studieren. Zur Verfügung stand bereits ein chimäres FCoV, das die 5'-nichttranslatierte Region sowie die Sequenzen der Gene 1a, 1b (5'-Bereich), E, M, N, 7ab und die 3'-nichttranslatierte Region von einem avirulenten FCoV Serotyp I und die Gene 1b (3'-Bereich), S und 3abc bereits von dem FIP induzierenden Serotyp II enthielt. Für die Generierung des virulenten rekombinanten FCoV Serotyp II wurden sämtliche Serotyp I Sequenzen durch die Serotyp II Sequenzen ersetzt. Im Anschluss sollte mittels Infektionsversuchen in Katzen nachgewiesen werden, dass das rekombinante

Serotyp II FCoV tatsächlich FIP induzieren kann. Nach Erkrankung an FIP sollte das Virus aus verschiedenen Organen der Tiere isoliert, ein genomlanger Sequenzvergleich mit der rekFCoV 79-1146 Input-Sequenz durchgeführt und auf Nukleotidveränderungen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Verwendung von feline Coronaviren als Vektor für die heterologe Genexpression. Zunächst sollte das rekombinante Serotyp I FCoV Stamm Black für die Expression der Strukturproteingene (ORF 2 und ORF 3) von feline Caliciviren anstelle der akzessorischen Gene 3abc bzw. 7ab verwendet werden. Zudem sollte ein GFP-exprimierendes rekombinantes Serotyp II FIPV 79-1146 hergestellt und für den Nachweis und für ergänzende Analysen zur Identifizierung der Treffzellen feline Coronaviren im Blut eingesetzt werden. Dies beinhaltete die Isolierung von PBMC aus dem Blut unterschiedlicher Katzen sowie die Infektion verschiedener Zellen, wie PBMC, CD14-positive Zellen und Monozyten/Makrophagen mit dem rekombinanten Serotyp II GFP-Virus.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
Bakterienschüttler	Heraeus
BD FACSCanto™ II	BD Bioscience
Bunsenbrenner Fireboy	IBS
Brutschrank (mit CO <sub>2</sub> -Begasung)	Labotec C200
Elektrophoresekammer	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad
Gefriergeräte	Liebherr, Bosch
Gelgießkammer	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Gel Print 2000L Dokumentations-System	MWG Biotech
Gel Print Dokumentationssystem	INTAS
Heizblock	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Heizblock	Roth
Inverses Immunfluoreszenz-mikroskop Axiovert 10	Zeiss
Kühlschränke	Liebherr
Kühlwasserbad RM6	Lauda
Lichtmikroskop Leica DM-IL	Leica
Magnetrührer	IKA
Mikrowelle	Micromaxx
Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage	Millipore
pH-Meter	Beckmann
Photometer Gene Quant II	Biotech
Schüttelinkubator	GFL
Sicherheitswerkbank LaminAir	Holten
Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2436	Heraeus
Thermocycler	Eppendorf
Thermocycler 2720	Applied Biosystems
Thermocycler Cyclone 25	Peqlab

Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermowasserbad	Memmert
Ultraschall Bad Sonorex RK 52	MAGV
UV Transluminator	Bachofer
Vortexer	Heidolph
Waage	Kern
Zentrifugen:	
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Biofuge primo	Heraeus
Centrifuge 5804R	Eppendorf
Labofuge 400 R	Heraeus
Mikrozentrifuge Butterfly	Roth
Ultrazentrifuge L 870	Beckmann

## 2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (40%)	Applichem
Agarose (Elektrophorese)	Gibco-BRL
Ammoniumpersulfat (10%)	Fluka
Ampicillin	Serva
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	Gibco-BRL
Chloroform	Roth
Cap-Analogon	New England Biolabs
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Roche Diagnostics GmbH
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol reinst/absolut	Fluka
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Formaldehyd (37%)	Merck
Glycerin	Merck
G418-Sulfat (Neomycin)	Sigma-Aldrich



Glyoxal (40%)	Fluka
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Milchpulver (4%)	Frema
Mykophenolsäure (MPA)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
Phenol	Roth
Puromycin	Alexis Biochemicals
RNase Inhibitor	Promega
Saccharose	AppliChem
TEMED	Fluka
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich
Tris	Gibco-BRL
Triton X-100	Fluka
Tween-20	Sigma-Aldrich
Xanthin	Sigma-Aldrich
X-Gal (Galactopyranosid)	ICN

### 2.3 Enzyme und Puffer

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
Human Placenta RNase Inhibitor	Invitrogen
Out 40 U/μl	
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Quick Ligase	New England Biolabs
Quick Ligase Puffer	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, TaKaRa, Fermentas
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, TaKaRa, Fermentas
T4-Ligase Puffer	New England Biolabs

## 2.4 Kits

Artikelbezeichnung	Hersteller
MACS Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotech
DynaBeads Oligo (dT)	Dynal Biotech
Expand Long System Template PCR System	Roche
Expand Reverse Transcriptase Kit	Roche
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purifikation Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
QIAGEN One Step RT-PCR Kit	Qiagen
PGEM-T easy Vector System I	Promega
RiboMax <sup>TM</sup> Large Scale RNA Production System T7	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen

## 2.5 Molekulargewichtsstandards

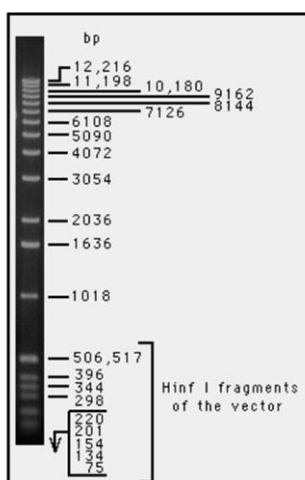


Abb. 2.1: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

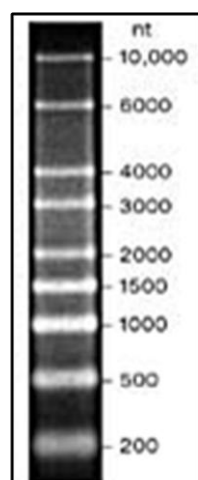


Abb. 2.2: Perfect RNA Marker 0,2-10 kb (Novagen)

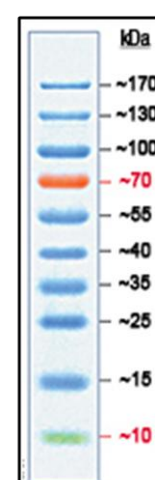


Abb. 2.3: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Invitrogen)

## 2.6 Oligonukleotide für RT-PCR und PCR

### 2.6.1 Oligonukleotide für das FCoV Genom (Stamm 79-1146)

Genbanknummer AY994055

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
79-25-F	5'-ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGC-3'	+
79-25-R-Esp3I	5'-CGTCTGCCACGCTACACTCACTTTACTTTAAAAGT-3'	-
79-25-R-Sall	5'-GTCGACGCTACACTCACTTTACTTTAAAAGT-3'	-
79-25-F-Esp3I	5'-CGTCTCCGTGGCTATAACTCTTCTTTTACTTT-3'	+
79-470-R	5'-ATGACGTAGTGATCCTTACGATTGC-3'	-
79-760-F	5'-GCCTGGCTAACAGTGCGCGATGAAA-3'	+
79-1230-F	5'-CTCTGTTTGGAAAGTGATTA AAACT-3'	+
79-1730-F-XhoI	5'-CTCGAGGAGGCTAAGTGCTTTGTGCTTGGTTC-3'	+
79-2230-R-SacII	5'-CCGCGGCTTAAGCGCTCTGAAACACAACCTTTT-3'	-
79-2250-R-SacII	5'-CCGCGGACTAGGATGTTTTTACCATCCTTAAG-3'	-
79-2460-F	5'-CTGGTACAGATGCATGCCAGCATGC-3'	+
79-2560-F	5'-AGTTTTGCTAATCGTTTAACGATTA-3'	+
79-3300-R	5'-ACACTTGCATCAGAATCGCTTTTGTC-3'	-
79-3505-F	5'-GAGCAACTTTCCTCAGTAGAAAAAAGATGAAGTCTCTGC-3'	+
79-3505-R	5'-GCAGAGACTTCATCTTTTTTTTCTACTGAGGAAAGTTGCTC-3'	-
79-3730-F-SacII	5'-CCGCGGTAAGAAAGATGATGTTATGCCTTTT-3'	+
79-4230-R-Sall	5'-GTCGACTTAGCTGTCATTACATTTGCATTAAG-3'	-
79-4230-R-XhoI	5'-CTCGAG TTAGCTGTCATTACATTTGCATTAAG-3'	-
79-4380-F	5'-GCCTGACGTCCTTGTTAACGCTGCT-3'	+
79-5590-F	5'-GGTTTAATGGTTGATGCCGATAAGG-3'	+
79-5680-R-Sall	5'-GTCGACGTTAGCAACAAAATTACTAGCAATGG-3'	-
79-6300-F	5'-ATGGAATAGAGTTATACAATTGTCG-3'	+
79-6500-R	5'-TTAAGTGCGAGAACTGCCTTAAAAA-3'	-
79-7300-F	5'-GCTATGGATATCGGTAAGTGCATGA-3'	+
79-7630-F	5'-TCAGTCTACAGTGTTGCAACTCAGT-3'	+
79-7730-R-SacI	5'-GAGCTCTAGAATCATCAAATGATTGAACAACA-3'	-
79-7800-F-Esp3I	5'-CGTCTCCATTTGACAAGTCCTGCCCTATTGTT-3'	+

79-8360-F	5'-TGTCTGTAGTAGCTACATCTGGTGC-3'	+
79-8590-F	5'-CTTGCATACCCAGGTGTTTTAGATGCGGGGTTTCATTA-3'	+
79-8590-R	5'-TAATGAACCCCGCATCTAAACACCTGGGTATGCAAG-3'	-
79-9020-F	5'-CCGGATTGAGAAAATGGCACAGCCTAGTGGTGTT-3'	+
79-9020-R	5'-AACACCACTAGGCTGTGCCATTTTCTCAATCCGG-3'	-
79-9925-F-BseRI	5'-GAGGAGTTAATCTTCAGAGTGGTTAAAGTGAAATCCATATTTT-3'	+
79-9925-R-BseRI	5'-GAGGAGTACCACTCTGAAGATTAACACCATACATTTGC-3'	-
79-9930-F-BamHI	5'-GGATCCGAGTGGTAAAGTGAAATCGATATTTT-3'	+
79-9930-R-Esp3I	5'-CGTCTCCTGAAGATTAACACCATACATTTGC-3'	-
79-9930-F-Esp3I	5'-CGTCTCCTTCAGAGTGGTAAAGTGAAATCCATATTTT-3'	+
79-10000-F	5'-TTCATGTATACACCCTTCACATGGA-3'	+
79-10450-R-NotI	5'-GCGGCCGCTATCAACATAGTAAGCATGTTTACAA-3'	-
79-10450-F	5'-TTTGCATCATACAAAGTTGCTTATT-3'	+
79-11200-F	5'-TTTGAGCGAGAAGCTTCCGTGCAA-3'	+
79-11300-R	5'-AAACTATGCATAGCTGAAACTATTT-3'	-
79-11700-R-NotI	5'-GCGGCCGCATTGTAGCAGATGCTTTAACAGCTTT-3'	-
79-12050-F	5'-CATATGTTGACGCTGTTAAACGAGG-3'	+
79-12600-F	5'-GTTATGGACCATGAGCAAGTCTGTT-3'	+
79-13250-F-Esp3I	5'-CGTCTCATACCACCCTAATTGCTCTGATTGTACAAG-3'	+
79-13251-F-BamHI	5'-GGATCCCCACCCTAATTGCTCTGATTGTACAAGTGA-3'	+
79-13750-R	5'-CTCTGTTGTAGCGGTAATAATTGAAG-3'	-
79-13750-F-XhoI	5'-CTCGAGCCGCTACAACAGAGTCACAGTACTTG-3'	+
79-13750-R-SacI	5'-GAGCTCCTCTGTTGTAGCGGTAATAATTGAAG-3'	-
79-13750-R-SalI	5'-GTCGAC CTCTGTTGTAGCGGTAATAATTGAAG-3'	-
79-14100-F	5'-TCAATTGCTGCAACACGCAATGCCA-3'	+
79-14220-R-XhoI	5'-CTCGAGGGTAAAGCACGGTCACACTTAGGATAGTC-3'	-
79-15100-F	5'-GTGACAATGCTAGAAGAAGGTCAAGATAAG-3'	+
79-15500-R-EcoRI	5'-GAATTCCAGTTTCAGCAGCGAAAATTTTCAGAG-3'	-
79-15660-F	5'-GCCCTAAGGAAATTGTACTCCAATGG-3'	+
79-16800-F-Esp3I	5'-CGTCTCTCTACACACAGACTTCCGATACACAGC-3'	+
79-16800-R-Esp3I	5'-CGTCTCTGTAGATAACATAATCATACTCACTACCCTGC-3'	-
79-17100-R	5'-TGACATTAGCATATTTAACATCCTT-3'	-
79-18100-F-BamHI	5'-GGATCCGGAAGTCAATGTAGACATGTACCCAGAG-3'	+

79-18500-R	5'-GGAGTGCTTTGCTATTAACAAAACCGTGCC-3'	-
79-19400-F-XhoI	5'-CTCGAGGTGCACTTATATGGACATACTCTTGGACG-3'	+
79-19900-R-Eag	5'-CGGCCGGTCTTCAATGTAAAGACTAGTACAATCACCTG-3'	-
79-20436-F-BamHI	5'-GGATCCATGATTGTGCTCGTAACTTGCCTCTTGTTG-3'	+
79-20436-F-Esp3I	5'-CGTCTCCATGATTGTGCTCGTAACTTGCCTCTTGTTG-3'	+
79-20436-F-SacII	5'-CCGCGGATGATTGTGCTCGTAACTTGCCTCTTGTTG-3'	+
79-20960-R-SacII	5'-CCGCGGGTCCGTGGGTATGACAGAGAAAGG-3'	-
79-20960-R-PstI	5'-CTGCAGGTCCGTGGGTATGACAGAGAAAGG-3'	-
79-21300-F	5'-GTTCCACTTTTGTAGTGGCAGGT-3'	+
79-21710-F-XhoI	5'-CTCGAGAAAGGAAATTGCTATTAGTAAGTGG-3'	+
79-21820-F	5'-GGACAATTGCTTACACATCGTATACTGAAGC-3'	+
79-21850-R-NotI	5'-GCGGCCGCCAACTTGTACTAATGCTTCAGTATACGATG-3'	-
79-22075-R-PstI	5'-CTGCAGTAACCACTAAGCTTCATACCAAGAT-3'	-
79-22200-R	5'-TCTTGATTAAAAATATTGTCCCAT-3'	-
79-22400-F	5'-AGAAGTCTATATGTAATATATGAAG-3'	+
79-22480-F-BseRI	5'-GAGGAGCGGTCCGCACGTAGACTCCT-3'	+
79-22480-R-BseRI	5'-GAGGAGGACAAATCGTGCGGACCGCTATTATC-3'	-
79-22825-F-SacII	5'-CCGCGGACGATGTTGATTGTGAACCTGTCATA-3'	+
79-23100-F	5'-TTGAACAAGCACTTGCAATGGGTGC-3'	+
79-23175-R-SacI	5'-GAGCTCCATTTTCCGAGACAAACAACATGGA-3'	-
79-23530-F	5'-GGTGCACTTGGTGGTGGCGCCGTGGC-3'	+
79-23530-R-NotI	5'-GCGGCCGCGCCACGGCGCCACCACCAAGTGCACC-3'	-
79-23900-R	5'-CATTAAGTGCTGTAAGTCTACCTGT-3'	-
79-24000-F	5'-AATGTGTTAGGTCTCAGTCTCAGAG-3'	+
79-24303-F-BamHI	5'-GGATCCGGGTGTGATGTGTTGTTTGTCAAC-3'	+
79-24303-F-XhoI	5'-CTCGAGGGGTGTGATGTGTTGTTTGTCAAC-3'	+
79-24795-R-NotI	5'-GCGGCCGCTTAGTGGACATGCACTTTTCAATTGG-3'	-
79-24795-R-PstI	5'-CTGCAGTTAGTGGACATGCACTTTTCAATTGG-3'	-
79-24795-R-Esp3I	5'-CGTCTCCACCATTTAGTGGACATGCACTTTTCAATTGG-3'	-
79-24795-R-Esp3I-GFP	5'-CCGTCTCCCATAAATCGTTTAGTTAGTGGACATGCACTTTT TCAATTGG-3'	-
79-24840-R-Esp3I	5'-CGTCTCATGTCCCATACAAGACCTGTAATGACTAA-3'	-
79-25000-F-XhoI	5'-CTCGAGTGAGGCTAAGGACAAAGCGTATGCT-3'	+

79-25200-F-XhoI	5'-CTCGAGGCCATTCTAAATTCCATGCGAAAATGATTGG-3'	+
79-25230-F QC	5'-GAAAATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTTAG-3'	+
79-25230-R QC	5'-CTAAGAGTGTTAAGAAAAAGTCCACCAATCATTTTC-3'	-
79-25365-R-Esp3I	5'-CGTCTCCACTAACAACCTGATGCTGTTGTAC-3'	-
79-25365-R-PstI	5'-CTGCAGCACTAACAACCTGATGCTGTTGTAC-3'	-
79-25370-F-Esp3I	CGTCTCTTAGTGCTAGAACACAAAATTATTACCCAG-3'	+
79-25670-F-SacII	5'-CCGCGGATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTT-3'	+
79-25800-R-EcoRI	5'-GAATTCCAGCATGAGCTAAGCCACGTATTGC-3'	-
79-25850-F-Esp3I	5'-CGTCTCGTATTTTCACAGGAGCCCGTAGCCGGT-3'	+
79-25880-F-BamHI	5'-GGATCCGTTTACAATGCAGCCTCTTCTCAGG-3'	+
79-25880-F-Esp3I	5'-CGTCTCGTTTACAATGCAGCCTCTTCTCAGG-3'	+
79-25970-R-Esp3I	5'-CGTCTCATGCCCTAGGGAACGTCATAGTTATGGTC-3'	-
79-26075-R-SacI	5'-GAGCTCTTAATAACATTTAGCAATGCTATTG-3'	-
79-26380-R-SacII	5'-CCGCGGGAAGTTCCAGTTAGCAAGATGCCAAATAAG-3'	-
79-26380-R-Sall	5'-GTCGACGAAGTTCCAGTTAGCAAGATGCCAAATAAG-3'	-
79-26380Kor+	5'-GATCTTATTTGGCATCTTGCTAACTG-3'	+
79-26380Kor-	5'-CAGTTAGCAAGATGCCAAATAAGATC-3'	-
79-26500-R	5'-AGTATGCATTAAAAATCGTAAGCGC-3'	-
79-26990-F-SacII	5'-CCGCGGGTAACATATGGTGTAACATAACTTTTC-3'	+
79-27050-R	5'-CTCCCCAGTTGACGCGTTGTCCCTGT-3'	-
79-27090-R	5'-CCGACCACGAGAGTTAGAACGACCACGTC-3'	-
79-27150-R	5'-GATCCTTGTTTCGAGGGTAATGGGGTTGTAG-3'	-
79-28300-F	5'-TGTAATTGTTTGCAGCTTTTGAAA-3'	+
79-29000-F	5'-GCTGAAAGTTTATGACTTGAAGCAATTCAG-3'	+
79-29330-R-SacI	5'-GAGCTCCACTAGATCCAGACGTTAGCTCTTCCATTG-3'	-
79-29355-R-SacI	5'-GTATCACTATCAAAAGGAAAATTTT-3'	-

## 2.6.2 Oligonukleotide für das FCoV Genom (Stamm Black)

Genbanknummer EU186072

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
A-515-ex-rev	5'-TCCGTTACCCAGAACACCAATGACGTAGTGATCCTTAC-3'	-
Genom-2900-forw	5'-CATTGTGCTTGGCTAACTGTGCGCG-3'	+
Genom-3200-rev	5'-GGGTTATTAATGTCAAATCCACCGCATGTGTC-3'	-
Genom-5500-forw	5'-GGTCCTGTAGTAGGAGATATCATTGATGC-3'	+
Genom-5800-rev	5'-CACGTCAGCATATTTACCGAGTGTTGTG-3'	-
BC-2-G1	5'-GGCTACAACCTATTGCAGAGTGGGAGAGTGACTG-3'	+
Genom-8450-rev	5'-ACTAGGAGAGTGCAATCACCAAAGATC-3'	-
Genom-11000-forw	5'-CACTGTGACCTTAGTGATCTTATTGAGTC-3'	+
Genom-11250-rev	5'-CGACTTCCTGTCCACGGCGCGTGCCTCTTTG-3'	-
Genom-14000-rev	5'-CTCCTCCCACAGTACGAGCTCTAGCCTTGCC-3'	-
Genom-13750-forw	5'-CAGAGTTACTGTTTTAGACATCTGTCAGGCGC-3'	+
D-rev-gpt	5'-GCACTGCTTTGACTCAGGGTTGACAGG-3'	-
Genom-17150-forw	5'-CACACGAGACTTTGCTATGCGT-3'	+
B-19890-F-Sall	5'-GTCGACCTGATTTGTATGATGGTTCCACCAAG-3'	+
B-20440-R-Esp3I	5'-CGTCTCATCATGGTGTGTTAACAAAGTGATTACCAAAG-3'	-
B-21980-F-XhoI	5'-CTCGAGATGCTTGTTAAAAATGATTTACC-3'	+
B-22480-R-PstI	5'-CTGCAGCATCTTTTACTAAATTAGAGATG-3'	-
B-22600-F	5'-TATTAGTGGTGATCTTCTCGCCTTTAAAAATAG-3'	+
B-22600-R	5'-CTATTTTTTAAAGGCGAGAAGATCACCATAATA-3'	-
Genom-22650-forw	5'-CACTGTAGTGCCATGTGATTTAAC-3'	+
B-22700-F	5'-GAGATAGTGGGAGCTATAACATCTGTTAAT-3'	+
B-22700-R	5'-ATTAACAGATGTTATAGCTCCCACTTATCTC-3'	-
B-22760-R-Esp3I	5'-CGTCTCCCGAGTGTGATGTCGACCTACGTGATCTCTT-3'	-
B-22785-F-Esp3I	5'-CGTCTCACTCGGTAACCACCTACAATATGCC-3'	+
B-23080-F-SacII	5'-CCGCGGGTAATGGCAATACACATTGCCGTA-3'	+
B-23235-F	5'-GAAAAGTTTAAACGCCACAGCCACAGGTGGTG-3'	+
B-23235-R	5'-CACCACCTGTGGCTGTGGCGTTAACTTTTC-3'	-
B-23580-R-SacI	5'-GAGCTCATAATTAAGCCTAGCCTGCACC-3'	-
D3abc-PCR1-G	5'-CAACACGTATATGGTAACTCCTCG-3'	+
D3abc-PCR1-R	5'-ATGCGAATTCCTTGACGGTGTCCATAAATCGTT-3'	-

B-24800-R-Esp3I	5'-CGTCTCATTTCATCTTGACGGTGTCCATAAATCGTT-3'	-
B-24840REsp3GFP	5'-CGTCTCCATCATACAAGACCTGTAATGACTAA-3'	-
B-25760-F-Esp3I	5'-CGTCTCCCTTTTCTCAGGCGGTTATAAACG-3'	+
B-25970-F QC	5'-TTGGGTAAGACTATTATAGTACTACCTGCAC-3'	+
B-25970-R QC	5'-GTGCAGGTAGTACTATAATAGTCTTACCCAA-3'	-
B-28030-R-Esp3I	5'-CGTCTCATTTCATGCGTTTAGTTTCGTAACCTCATCAAT-3'	-
B-28955-F-Esp3I	5'-CGTCTCGGCAACCCGATGTTTAAACTGG-3'	+
B-29080-F-BamHI	5'-GGATCCGGCACCCGATGTCTAAACTGGTCTTTCCGAGG-3'	+

### 2.6.3 Oligonukleotide für das Vaccinia Virus Genom (Stamm vNo1/tk)

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
VVL1	5'-CTTAACGATGTTCTTCGCAGATG-3'	-
VVR1	5'-GCGTCCATAGTCCCGTTCCGT-3'	+
VVR1-F-XhoI	5'-CTCGAGGCGTCCATAGTCCCGTTCCGT-3'	+

### 2.6.4 Oligonukleotide für das FCV Genom (Stamm 2024), ORF 2 und ORF 3

Genbanknummer AF479590

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
D3abc-FCV-F-BsaI	5'-GCGGTCTCTTATGGCTGATGATGGGTCTATCACGTCACCTG-3'	+
D7ab-FCV-F-BsaI	5'-GCGGTCTCGCATGGCTGATGATGGGTCTATCACGTCACCTG-3'	+
FCV-rev-sel	5'-CAAGGTATGGGTAAAGTAGTGGTCC-3'	-
FCV 701 F	5'-TTGTTGTGCCTCCAGGGGTCAACCC-3'	+
FCV-F1-seq	5'-CGTTCTCTTTGATGCTCGTCAAGTGG-3'	+
FCV-F2-seq	5'-CTACAGCCAAAGATTATGATTCGGCC-3'	+
FCV-forw-sel	5'-GAGCAGAGGGTACAAGGCCCTATCC-3'	+
D3abc-FCV-R-BsaI-jo	5'-GCGGTCTCAAAAGTCAATTTTTAAACAGATTTCTATATGATAGTC-3'	-
D7ab-FCV-R-BsaI-jo	5'-GCGGTCTCTTGTCTCAATTTTTAAACAGATTTCTATATGATAGTC-3'	-



## 2.6.5 Oligonukleotide für das Reportergen GFP

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
GFP-V-rev	5'-TAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGG-3'	-
GFP-V-forw	5'-CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG-3'	+
3abc-GFP-F-Esp3I	5'-CGTCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA-3'	+
3abc-GFP-R-Esp3I	5'-CGTCTCGTAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	-

## 2.6.6 Oligonukleotide für Plasmide

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol
M13 F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	+
M13 R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	-
GPT-250s	5'-GAAGGCGATGGCGAAGGCTTCATCG-3'	+
GPT-300as	5'-AGTGCGCTTTTGGATACATTTACAG-3'	-
pGEMT-BstZI-F	5'-CGTCGCATGCTCCCGGACGCCATGGCCGCGG-3'	+
pGEMT-BstZI-R	5'-CCGCGGCCATGGCGTCCGGGAGCATGCGACG-3'	-
pGEMTBstZI2.F	5'-ATCACTAGTGCGGACGCCTGCAGGTCGA-3'	+
pGEMTBstZI2.R	5'-TCGACCTGCAGGCGTCCGCACTAGTGAT-3'	-

## 2.7 Medien, Lösungen und Puffer

### 2.7.1 Allgemeine Medien und Puffer

#### Ca/Mg-Lösung

0,1 g/l  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1,16 g/l  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in 950 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$   
gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert

#### PBS defizient

0,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 950 ml  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$  gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert

---

<u>PBS<sup>++</sup></u>	950 ml PBS defizient mit Zusatz von 50 ml Ca/Mg-Lösung
-------------------------	--

### 2.7.2 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

<u>2% SDS (w/v)</u>	6 M Harnstoff, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS (w/v), 10% Glycerol (v/v), 0,025% Bromphenolblau (w/v), 0,025% Phenolrot (w/v)
<u>3 x Jagow Gelpuffer</u>	0,3 M Tris-HCl (pH 8,45), 0,3% SDS
<u>10 x Anodenpuffer</u>	0,2 M Tris-HCl (pH 8,9)
<u>10 x Kathodenpuffer</u>	0,1M Tris-HCl (pH 8,25), 0,1M Tricin, 1% SDS (w/v)
<u>10 x Transferpuffer</u>	480 mM Tris-HCl, 390 mM Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub> , 20% Methanol (v/v)
<u>Blockierlösung</u>	4% Milchpulver in PBS, 0,1% TWEEN 20
<u>Waschpuffer</u>	PBS, 0,1% TWEEN 20

### 2.7.3 Medien und Puffer für das Arbeiten mit Bakterien (*E. coli*)

<u>Luria-Bertani-Broth (LB)-Medium</u>	1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 1% NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub> , pH 7.5
<u>LB-Agar</u>	LB-Medium, 2% Agar
<u>LB-Amp-Medium/-Agar</u>	Zugabe von Ampicillin (100 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml

<u>SOC-Medium</u>	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
-------------------	---

## 2.7.4 Medien und Puffer für das Arbeiten mit Säugerzellen

<u>Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen</u>	10% (v/v) DMSO in FKS
--	-----------------------

<u>Fetales Kälberserum (FKS)</u>	PAA Laboratories
<u>Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus</u>	GE Healthcare

<u>MACS Puffer</u>	1 x PBS, 2% FKS, 2mM EDTA
--------------------	---------------------------

<u>MEM non-essential Amino Acid</u>	Sigma
-------------------------------------	-------

<u>β-Mercaptoethanol</u>	Gibco
--------------------------	-------

<u>Minimum Essential Medium (MEM) Eagle</u>	Sigma
---	-------

<u>Natriumpyruvat</u>	Sigma
-----------------------	-------

<u>Opti-MEM I</u>	Gibco
-------------------	-------

<u>Penicillin/Streptomycin 500x</u>	50.000 U/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat; in H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub> gelöst, sterilfiltriert (0,1 µm) und bei -20°C gelagert
-------------------------------------	--

<u>RPMI-1640 Medium</u>	Sigma
-------------------------	-------

<u>Trypanblau-Lösung</u>	0,25% (w/v) Trypanblau, 0,15 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub> , filtriert (0,2 µm), bei 4°C gelagert
--------------------------	--

Trypsin-Lösung 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2,5 g/l Trypsin, 1:300, 0,16 g/l Phenolrot in H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> gelöst, sterilfiltriert (0,1 µm), bei 4°C gelagert

Zellkulturmedium (CCM34) 4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxanthin, 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO<sub>3</sub>, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

### 2.7.5 Puffer für Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Aqua dd<sub>DEPC</sub> doppelt deionisiertes H<sub>2</sub>O mit 0,2% (v/v) Diethylpyrocarbonat für 4 Stunden gerührt, autoklaviert

Aqua dd<sub>PCR</sub> doppelt deionisiertes autoklaviertes H<sub>2</sub>O für PCR (Roth)

DNA-Auftragepuffer für Agarosegele 0,1% (w/v) Orange G, 5% (w/v) Ficoll 400 in 5 x TAE-Puffer, 4°C

DNA-Größenmarker 40 µg DNA (1 kb; 100 bp DNS-Größenmarker, Invitrogen), 250,0 µl DNA-Auftragepuffer, 1,0 ml TE-Puffer, 4°C

Nukleotidmix 25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, bei -20°C gelagert

Orange G (0,25%) 2,5 ml Orange G 1%, 3,0 ml Glycerin, 4,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>

10 x PCR-Puffer Fa. NaTuTec

<u>Puffer A (2,5 x)</u>	125 mM Tris (pH 8,3), 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM DTT, 1,25 mM dNTPs, -20°C
<u>Puffer B (5 x)</u>	25 mM Tris (pH 8,3), 100 mM KCl, 6,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1,25 mM dNTPs, 0,5% Triton X 100, 0,1% BSA, -20°C
<u>TAE-Gelelektrophorese-Puffer (50 x)</u>	2 M Tris, 0,25 M Na-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 7,8 mit Eisessig einstellen
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, in H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub> gelöst, pH 7,6

## 2.7.6 Puffer für DNA-Isolierung und Aufreinigung

<u>2 x Proteinase-K Puffer</u>	200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,4% (w/v) SDS, 400 mM NaCl
<u>10 x DNase Puffer</u>	400 mM Tris-HCL (pH 8), 100 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM CaCl <sub>2</sub>
<u>10 x Puffer A</u>	100 mM Tris-HCL (pH 7,5), 10 mM EDTA

## 2.8 Zellen

### 2.8.1 Eukaryontische Zellen

BHK-21-Zellen (Baby-Hamsternierenzellen)	ATCC Nummer: CCL-33
BHK <sub>FCoV-N</sub> -Zellen (BHK-21-Zelllinie, die das N Protein von FCoV über das Tet-On System exprimiert)	Institut für Virologie, Giessen
CV-1-Zellen (Affennieren Fibroblastenzellen)	ATCC Nummer: CCL-70

D98OR-Zellen (HeLa-Zelllinie, humane  
Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)  
FCWF-4-Zellen (Katzenfetenzellen)

G. L. Smith, Imperial College, London,  
UK  
Institut für Virologie, Giessen

### 2.8.2 Prokaryontische Zellen

*E. coli* K12-Stamm HB 101  
*E. coli* K12-Stamm JM 109

Institut für Virologie, Giessen  
Institut für Virologie, Giessen

### 2.9 Viren

FCoV Black Stamm  
FCoV Stamm 79-1146  
FCV Stamm 2024

beschrieben in: Black et al., 1980  
beschrieben in: McKeirnan et al., 1981  
beschrieben in: Thumfart und Meyers,  
2002

rekFCoV Black  
rekFCoV Black, GFP  
Vaccinia Virus Stamm vNotI/tk

beschrieben in Tekes et al., 2008a  
beschrieben in Tekes et al., 2008a  
beschrieben in Merchlinsky und Moss,  
1992

### 2.10 Plasmide

pBluescript II SK (+)  
pGPT-1  
pEGFP  
pCH1

Stratagene  
beschrieben in Herzig, 2004  
Volker Thiel, KSSG Schweiz  
beschrieben in Luttermann und  
Meyers, 2007

### 2.11 Antikörper

Primärantikörper:

Maus anti-human CD14, FITC konjugiert  
Maus anti-human CD14, Biotin konjugiert;  
Nachweis über SA-PC7  
Maus anti-Katze CD5, FITC konjugiert

Miltenyi Biotec  
Reinhard Maier, KSSG Schweiz  
Southern Biotec

Ratte anti-Maus CD45R/B220, PerCP konjugiert	BD Pharmingen
Maus anti-Katze CD13	beschrieben in Hohdatsu et al., 1998
Maus anti-Katze CD13, APC konjugiert	Reinhard Maier, KSSG Schweiz
Maus anti-Katze CD13, Biotin konjugiert	Reinhard Maier, KSSG Schweiz
Sekundärantikörper:	
Ziege anti-Katze IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert	Dianova
Ziege anti-Maus IgG, Cy3 konjugiert	Dianova

## 2.12 Verbrauchsmaterialien

BioMax Filme	Kodak
Einkanalpipetten	Biohit, Gilson
2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	
Elektroporationsküvetten	Molecular Bioproducts
Gewebekulturplatten, -schalen	Falcon
Handschuhe (Rotiprotect <sup>®</sup> , Latex, Nitril)	Roth
Kryoröhrchen	Nalgene
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen aerosolresistent, nukleasefrei	Nerbe
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Falcon BD
Zellkulturflaschen	Falcon

### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden zur Präparation von DNA

##### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Vervielfältigung von DNA. Dazu müssen die flankierenden Sequenzen der Ziel-DNA bekannt sein. Durch Hitzedenaturierung bei 94°C für 2 min wird die DNA zunächst in ihre Einzelstränge zerlegt. Die im Überschuss zugegebenen Oligonukleotid-Primer lagern sich dann bei einer spezifischen *Annealing*-Temperatur an die Enden der *Template*-DNA an. Die *Annealing*-Temperaturen der Oligonukleotid-Primer sind abhängig von Basenzusammensetzung und Länge der Oligonukleotide. Die *Annealing*-Temperatur liegt im typischen Fall 5°C unter der Schmelztemperatur (*temperature of melting*,  $T_m$ )-Wert der verwendeten Primer.

Als Faustregel gilt:  $T_m = (A+T) 2^\circ\text{C} + (G+C) 4^\circ\text{C}$

Die *Annealing*-Temperatur lag in dieser Arbeit zwischen 55°C und 60°C. Durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C wird das Aktivitätsoptimum der eingesetzten Polymerase erreicht. Von den Primern ausgehend verlängert die Polymerase in 5'-Richtung den gewünschten DNA-Abschnitt mit Hilfe der im Ansatz enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) (Elongation). Dieser Prozess wird zyklisch wiederholt, sodass das gewünschte DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt wird. Für die Amplifizierung von PCR-Fragmenten bis 4 kb wurde in dieser Arbeit die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Diese eignet sich jedoch nicht für die Amplifizierung größerer (> 4 kb) PCR-Fragmente. Hierzu wurde das „Expand Long Template System“ von Roche nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Standardmäßig wurde die PCR-Reaktion wie folgt angesetzt (50 µl Reaktionsvolumen):

10 x PCR-Puffer	5,0 µl	<u>Reaktionsbedingungen</u>		
dNTP-Mix	0,5 µl	Denaturierung	94°C	2 min
Primer <i>forward</i> (F)	0,5 µl	Denaturierung	94°C	30 sec
Primer <i>reverse</i> (R)	0,5 µl	Annealing	55-60°C	30 sec
DNA-Template	2,5 µl	Elongation	72°C	1 min/kb
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3 µl	Elongation	72°C	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	40,7 µl			

} 25-30 x



### 3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Bei der ortsgerichteten Mutagenese werden Mutationen (Deletionen, Insertionen etc.) in doppelsträngige DNA-Vektoren mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase eingefügt. Für jede Mutagenese wurden zwei komplementäre Oligonukleotid-Primer hergestellt, die die gewünschte Mutation enthielten. Diese Primer sind in der Regel 30-40 bp lang, da sich zu beiden Seiten der Mutation noch etwa 15 Basen Matrizen-homologe Sequenz befinden sollten; der GC-Gehalt sollte über 40% und die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) oberhalb von 78°C liegen. Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion mit dem Wildtyp (WT)-Plasmid als Matrize eingesetzt, in deren Verlauf das gesamte Plasmid mit der gewünschten Mutation amplifiziert werden konnte. Für die Synthese der mutagenen DNA wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5,00 µl	<u>Reaktionsbedingungen</u>		
dNTP-Mix	1,00 µl	Denaturierung	95°C	30 sec
Primer (F)	1,25 µl	Denaturierung	95°C	30 sec
Primer (R)	1,25 µl	Annealing	55°C	1 min
DNA-Template	1,50 µl	Elongation	68°C	1 min/kb
<i>Pfu</i> -Polymerase	1,00 µl	Elongation	68°C	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	39,00 µl			

} 12-18 x

Anschließend wurde die Matrizen-DNA durch einen einstündigen *DpnI*-Verdau bei 37°C abgebaut und die neusynthetisierte DNA in *E. coli*-HB101-Zellen transformiert (siehe Kapitel 3.3.2.2).

### 3.1.3 Reinigen von DNA

#### 3.1.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der zu extrahierenden Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion. Der zu reinigenden DNA wurde ein äquivalentes Volumen an Phenol zugegeben, gemischt und zur Phasentrennung für 4 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteine wurden dabei denaturiert und reicherten sich in der unteren, organischen

Phase an. Die obere, wässrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wieder abgenommen, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und die DNA mit 2,5 Volumina 100% Ethanol gefällt. Die ausgefallene DNA wurde nach der Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in einem Volumen von 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

### **3.1.3.2 Aufreinigen von DNA-Fragmenten**

DNA-Produkte aus PCR-Reaktionen und DNA-Fragmente aus enzymatischen Reaktionen wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers von Primern, Nukleotiden, Enzymen und Salzen befreit. Die Reinigung beruht auf der Bindung der Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, während Kontaminanten die Membran passieren.

### **3.1.3.3 Gelextraktion**

Bei der Gelextraktion wurden die DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung und das Aufreinigen elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### **3.1.4 DNA-Isolierung**

#### **3.1.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryonten, die im analytischen Maßstab für Restriktionsanalysen, Klonierungs- oder Transformationsexperimente benötigt wurde, erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

#### **3.1.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryonten im präparativen Maßstab erfolgte mit dem „Plasmid Midi Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

#### **3.1.4.3 Isolierung von DNA (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen im analytischen Maßstab**

Für die Isolierung von genomischer DNA verschiedener Vaccinia Viren wurden infizierte CV-1-Zellen aus einer 6-Loch-Platte mechanisch von der Oberfläche entfernt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Proteinase-K-Puffer, 200 µl H<sub>2</sub>O sowie 4 µl Proteinase-K (10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch bei 55°C für zwei Stunden inkubiert. Die DNA-Reinigung erfolgte über Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation (siehe Kapitel 3.1.3.1).

#### **3.1.4.4 Isolierung von DNA (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen im präparativen Maßstab**

Um eine größere Menge genomischer DNA verschiedener Vaccinia Virus Klone für die *in vitro* Transkription (siehe Kapitel 3.4.4) zu gewinnen, wurde die Isolierung von Vaccinia Virus DNA aus infizierten BHK-21-Zellen im präparativen Maßstab angewandt. Dabei wurden die mit Vaccinia Virus infizierten BHK-21-Zellen aus fünfzehn Zellkulturflaschen (Oberfläche 150 cm<sup>2</sup>) gewonnen und für 5 min bei 3200 rpm und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml kaltem Puffer A (10 mM Tris-Cl, pH 9.0; 1mM EDTA) resuspendiert und die Zellen mit einem auf Eis gekühlten Glashomogenisator aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Virus-haltige Homogenisat in einer Kühlzentrifuge für 5 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Da die Vaccinia Viren stark zellgebunden sind, wurde zu dem Überstand 0,25% w/v Trypsin gegeben und für 45 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Viruspartikel mittels Saccharose-Dichtezentrifugation. Dafür wurden in einem Ultrazentrifugenröhrchen 18 ml gekühlte 36%ige Saccharose vorsichtig mit der Virussuspension überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte mit einem SW28-Rotor für 80 min bei 13500 rpm und 4°C. Nach der Zentrifugation waren die Viruspartikel sedimentiert; der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1,4 ml Puffer A aufgenommen und auf sieben Eppendorf-

Röhrchen à 200 µl aufgeteilt. Zu jedem Röhrchen wurden 20 µl 10 x DNase-Puffer und 2 µl DNase gegeben, vorsichtig über Kopf geschwenkt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA und einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C wurde die DNase inaktiviert. Um die Vaccinia Virus DNA zu isolieren erfolgte im Anschluss ein Proteinase-K-Verdau; 220 µl Proteinase-K-Puffer sowie 4 µl des Enzyms Proteinase-K wurden zu den sieben Röhrchen pipettiert und für zwei Stunden bei 55°C inkubiert. Die DNA-Reinigung erfolgte über Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation (siehe Kapitel 3.1.3.1).

### **3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Größenauftrennung von Nukleinsäuren erfolgte über eine Agarose-Horizontal-Gelelektrophorese. Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen zwischen 1,5 und 2,0% (w/v) gewählt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, abgekühlt und in horizontale Flachgelapparaturen mit aufgesetztem Kamm gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Flachbettkammer beladen, wobei die Proben zuvor mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt wurden. In die Kammer wurden anschließend 4-8 µl Ethidiumbromid gegeben. Zur Größenbestimmung der Nukleinsäurefragmente wurden jeweils 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 110 Volt/400 mA. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und lässt sich im UV-Licht zu einer spezifischen Fluoreszenz anregen (Waring, 1965). Dadurch konnten die Nukleinsäurefragmente im UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 245 nm durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids optisch wahrgenommen und mit einer Gel-dokumentationsanlage photographisch dokumentiert werden.

### **3.1.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde photometrisch über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Die Messung von H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> diente der Bestimmung des Nullwertes, gegen den gemessen

wurde. Da 1 OD<sub>260</sub> etwa 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA entspricht, kann durch folgende Formeln aus der OD<sub>260</sub> die Konzentration der Lösung kalkuliert werden:

DNA-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD<sub>260</sub> x Verdünnungsfaktor x 50

RNA-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD<sub>260</sub> x Verdünnungsfaktor x 40

### **3.1.7 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen von DNA-Proben wurden durch die Firmen Qiagen, Agowa und Seqlab vorgenommen.

## **3.2 Methoden zur Klonierung von DNA**

### **3.2.1 Restriktion**

Das Schneiden der DNA erfolgte mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Die enzymatischen Reaktionen wurden in den für die jeweiligen Enzyme vom Hersteller vorgegebenen Puffern durchgeführt und entsprechende Inkubationsbedingungen gewählt.

### **3.2.2 Dephosphorylierung**

Um eine Religation in Ligationsansätzen zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Hierzu wurde nach der Restriktion die zu dephosphorylierende DNA mit 1,5 µl alkalischer Phosphatase versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert.

### **3.2.3 Ligation**

Bei der Ligation katalysiert die T4-Ligase die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe, wodurch DNA-Fragmente mit glatten oder überstehenden Enden miteinander verknüpft werden. Zur Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte wurde das pGEM-T Kit von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. In diesem Fall beruhte die Ligation auf dem Prinzip der Aneinanderlagerung von A/T-

Überhängen der PCR-Produkte mit komplementären Überhängen des linearisierten Vektors. Gerichtete Klonierungen wurden in einem Gesamtansatz von 20 µl nach Zugabe von T4-Ligase und Ligationspuffer über Nacht bei 14°C oder nach Zugabe von Quick Ligase und Ligationspuffer für 20 min bei RT inkubiert.

### **3.3 Mikrobiologische Methoden**

#### **3.3.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien**

Vorkulturen bzw. Übernachtskulturen wurden aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer LB-AMP-Platte in Flüssigmedium angeimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler. Auf LB-AMP-Platten konnten die *E. coli*-Zellen für 4-6 Wochen bei 4°C gelagert werden. Die längerfristige Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte in Glycerinkulturen. Hierzu wurden 800 µl einer Übernachtsflüssigkultur mit 200 µl autoklaviertem Glycerin (80-100%) versetzt und bei -70°C gelagert. Die optische Dichte einer Flüssigkultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) im Spektralphotometer gemessen und diente als Maß für das Zellwachstum.

#### **3.3.2 Transformation von Bakterien**

##### **3.3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur von HB 101 oder JM 109 *E. coli*-Zellen 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C inkubiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Zellen auf Eis wurden diese anschließend in Falcongefäßen für 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Bakterienpellet vorsichtig in 30 ml kalter 80 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 4°C vorsichtig in 4 ml kaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> + 20% Glycerol resuspendiert. Nach dem Aliquotieren war die Lagerung bei -70°C möglich.

### 3.3.2.2 Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation von *E. coli* (Hanahan, 1983) erfolgte mittels Hitzeschock, wobei kompetente Zellen einer Temperatur von 42°C ausgesetzt wurden, um die Bakterienmembran für die Fremd-DNA permeabel zu machen. Für die Transformation wurden pro Transformationsansatz 100 µl kompetente *E. coli* (HB101 oder JM 109)-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für eine Minute der Hitzeschock. Danach wurde der Ansatz sofort für 3-5 min auf Eis gestellt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min bei 3000 rpm pelletiert. Nach Abnahme von 500 µl des Überstands wurde das Zellpellet in den verbliebenen 100 µl Medium resuspendiert, auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen und die Platte mit der Bakterienseite nach unten über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Transformation von Ligationsansätzen aus PCR-Klonierungen wurden vor dem Ausstreichen der transformierten Bakterien die LB-Amp-Agarplatten zur Blau/Weiß-Selektion mit 40 µl X-Gal bestrichen.

## 3.4 Arbeiten mit RNA

### 3.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung von Total-RNA aus Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ und mit dem „QIAshredder“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Aufgrund der Polyadenylierung der genomischen und subgenomischen coronaviralen RNAs an ihrem 3'-Ende wurde die mRNA-Isolierung mit dem „Oligio(dT)-Dynabeads Kit“ von Dynal nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.4.2 RNA-Isolierung aus Plasma, Serum, Urin oder Zellkulturmedium

Die Isolierung von Total-RNA aus Plasma, Serum, Urin oder Zellkulturmedium erfolgte mit dem „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### 3.4.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird erst aus einer beliebigen RNA cDNA synthetisiert und diese anschließend als Template für eine PCR verwendet. Für RT-PCR-Produkte kleiner als 4 kb wurde das folgende Protokoll benutzt:

		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
<u>Start-Mix</u>	0,5 µl Primer (R)	Denaturierung	93°C, 3 min
	8,5 µl H <sub>2</sub> O dd	Abkühlung	4°C, 2 min
	2,5 µl Proben-RNA		
		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
<u>RT-Mix</u>	8,00 µl Puffer A	cDNA Synthese	42°C, 30 min
	0,25 µl RNase Inhibitor	Enzymdenaturierung	94°C, 2 min
	0,25 µl Reverse Transkriptase		
		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
<u>PCR-Mix</u>	19,3 µl H <sub>2</sub> O dd	30 Zyklen	
	10,0 µl Puffer B	Denaturierung	94°C, 30 sec
	0,5 µl Primer (F)	Annealing	55-60°C, 30 sec
	0,2 µl Taq-Polymerase	Elongation	72°C, 1 min/kb
		abschließende Elongation	72°C, 5 min

Für RT-PCR-Produkte größer als 4 kb wurde die RNA mit dem „Expand Reverse Transcriptase Kit“ von Roche nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. Für die anschließende Amplifizierung der cDNA wurde das „Expand Long Template PCR System Kit“ von Roche verwendet (siehe Kapitel 3.1.1).

### 3.4.4 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde das „RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit“ von Promega verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 20 µl mit *Clal* verdaute Vaccinia Virus DNA nach Phenol-Chloroformreinigung (siehe Kapitel 3.1.3.1). Standardmäßig wurde der *in vitro* Transkriptionsmix wie folgt angesetzt:



3,75 µl	ATP, CTP, UTP
0,7 µl	GTP
5,0 µl	Cap-Analogon (30 mM m7G(5')ppp(5')G)
10,0 µl	5 x T7-Transkriptionspuffer
1,0 µl	Human Placenta RNase Inhibitor Out 40 U/µl
5,0 µl	T7-Enzymmix

Die Reaktion wurde für 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase, um die restlichen Vaccinia Virus DNA zu entfernen. Von der RNA wurde 1 µl auf ein 1%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetragen, um das Transkript nachzuweisen und die Qualität zu kontrollieren. Nach der Gelanalyse wurde die gesamte Menge an RNA in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 3.6.6.2).

### 3.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.5.1 Zellyse

Vor der Zellyse wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse in 2% Natriumdodecylsulfat (SDS).

#### 3.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht es, Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch das anionische Detergenz SDS werden die Proteine denaturiert und proportional zu ihrer Größe mit negativen Ladungen versehen. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur positiven Elektrode. Ein vorgefärbter Marker, der Proteine bekannter Größen enthält und ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird, ermöglicht später eine Größenabschätzung. Für die Untersuchung des N-Proteins von feline Coronaviren (ca. 400 AS) wurde das Trenngel mit einem Acrylamid-Anteil von 10% in Gelpuffer und das Sammelgel mit 4% in Gelpuffer angesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in vertikalen Elektrophoreseapparaturen bei 80 V während der Passage durch das Sammelgel und bei 120 V während der Passage durch das

Trenngel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Trenngel im Western Blot eingesetzt.

### **3.5.3 Western Blot**

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine mittels eines elektrischen Feldes von einem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Die Proteine sind dann auf der Nitrozellulose-Membran immobilisiert und spezifische Antikörper können an das gesuchte Protein binden. Der Transfer wurde bei 77 V für 54 min bei 4°C in einer Nassblotkammer durchgeführt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 4% Milchpulver für 30 min bei 4°C blockiert. Es erfolgten ein Waschschrift, die Zugabe des primären Antikörpers und eine einstündige Inkubation bei RT. Nach einem 30-minütigen Waschschrift mit dreimaligem Wechsel des Waschpuffers erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei RT. Der anschließende Waschschrift mit erneut dreimaligem Wechsel des Waschpuffers wurde eine Stunde bei RT durchgeführt und der Blot danach entwickelt. Zur Darstellung des Signals wurden BioMax Filme bei Belichtungszeiten von 30 sec bis 20 min verwendet.

## **3.6 Zellbiologische Methoden**

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank statt.

### **3.6.1 Kultivierung von Säugetierzellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser oder in Zellkulturflaschen (Oberfläche 150 cm<sup>2</sup>) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Zur Vermehrung wurden die Zellen zweimal pro Woche mit einer Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst und in geeigneten Verdünnungen in frischem Medium ausgesät. Allen Medien wurde 1 ml Penicillin/Streptomycin und 10% fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Die verwendeten Zelllinien sowie Medien und Zusätze sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tab. 3.1: Übersicht der Zelllinien und ihrer Medien und Zusätze**

<b>Zelllinie</b>	<b>Medien und Zusätze</b>
FCWF-4, Katzenfetenzelllinie	CCM-34
BHK-21, Babyhamsternierenzelllinie	CCM-34
BHK <sub>FCoV-N</sub> , Babyhamsternierenzelllinie	CCM-34 + G418 (50 mg/ml) + Puromycin (2 mg/ml)
CV-1, Affennierenfibroblastenzelllinie	MEM Eagle
D98OR, humane HeLa-Zelllinie	MEM Eagle

### 3.6.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die Konservierung von Zellen wurden Zellen aus einer Zellkulturschale abgelöst (siehe Kapitel 3.6.1), in 4,5 ml Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst in einem Einfriergerät („Mr. Frosty“, Nalgene) auf -70°C heruntergekühlt und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und in Kulturgefäße ausgesät.

### 3.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl lebender Zellen wurde der Zellrasen trypsiniert (siehe Kapitel 3.6.1). Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstests, bei dem tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und dadurch blau angefärbt werden. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypanblau-Lösung vermischt und die lebenden Zellen in vier Großquadranten einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Diagonale) unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$n \times V \times 1250 = \text{Zellzahl/ ml}$$

(n = Anzahl der Zellen in vier Großquadranten, V = Verdünnungsfaktor).

### 3.6.4 Färbung adhärenter Zellen mit Kristallviolett

Um einen zytopathischen Effekt (ZPE) in Zellkulturen makroskopisch sichtbar zu machen, wurden adhärenente Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Dazu wurden die Zellen nach dem Entfernen des Mediums für 20 min bei 4°C mit einer 2%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend wurde das Paraformaldehyd entfernt, die Zellen vorsichtig einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit einer Kristallviolettlösung bei RT gefärbt.

### 3.6.5 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen wurde der Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen abgenommen und die Zellen mit Medium ohne FKS gewaschen. Die Infektion der Zellen erfolgte jeweils mit einer definierten Menge an Virussuspension unbekannten Titters für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen, durch frisches Medium mit FKS ersetzt und der jeweilige Ansatz für 24-72 h bei 37°C inkubiert. Bei der Verwendung von Virussuspensionen mit bekanntem Titer zur Infektion von Zielzellen wurde ein bestimmtes Verhältnis von Virus zu Zelle verwendet.

Die *multiplicity of infection* (MOI) wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{MOI} = \frac{\text{ml Virussuspension} \times \text{Virustiter/ml}}{\text{Zellzahl}}$$

Für die Infektion wurde die entsprechende Virussuspension in Medium ohne FKS verdünnt, auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

### 3.6.6 Transfektion von RNA und DNA in Säugetierzellen

#### 3.6.6.1 Chemische Transfektion

Für die chemische Transfektion wurden CV-1-Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h mit dem rekombinanten Vaccinia Virus für 2 h bei 37°C infiziert. Während der Infektion wurden zwei Röhrchen mit je 250 µl Transfektionsmedium

(Opti-MEM von Gibco) vorbereitet. Zu einem Röhrchen wurden 10 µl Lipofectamine 2000 pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert, zu dem anderen Röhrchen wurden ca. 4 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach Ablauf der 5 min wurden die Inhalte der beiden Röhrchen vorsichtig gemischt und für 30-120 min bei RT inkubiert. Nach der zweistündigen Infektion wurde das Medium von den infizierten CV-1-Zellen abgenommen, durch das Transfektionsmedium plus den Transfektionsansatz ersetzt und für 5-6 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel mit MEM-Medium und eine Inkubation der transfizierten Zellen für 48-72 h im Brutschrank. Der Ansatz konnte dann für die Positiv- oder Negativselektion von rekombinanten Vaccinia Viren verwendet werden (siehe Kapitel 3.7.3.1 und 3.7.3.2). Dafür wurden die Zellen nach der Infektion/Transfektion von der Oberfläche gelöst und in 600 µl Medium aufgenommen.

### 3.6.6.2 Physikalische Transfektion

Für das Einbringen von *in vitro* transkribierten rekombinanten FCoV-RNAs genomischer Länge in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen wurde die Methode der physikalischen Transfektion angewendet. Dabei wurden die BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen, die am Tag zuvor mit Doxycyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml induziert wurden, von der Zellkulturschale abgelöst (siehe Kapitel 3.6.1), für 4 min bei 3200 rpm pellettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Zu den Zellen wurden ca. 4 µg RNA gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch 2 Pulse bei 330 V, 1000 µF und 70 Ω. Die Zellen wurden in eine Zellkulturschale gegeben und mit FCWF-4-Zellen für 48-72 Stunden bei 37°C kokultiviert.

### 3.6.7 Zellisolierung

#### 3.6.7.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus Blut

Die Isolierung von PBMC aus dem Gesamtblut einer Katze erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Paque-Gradienten. Dazu wurde das Blut mit EDTA versetzt und vorsichtig unverdünnt oder mit PBS verdünnt auf Ficoll-

Paque geschichtet. Das Gemisch wurde für 25 min bei 500 x g abzentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine höhere Dichte und werden durch das Ficoll hindurchzentrifugiert, während mononukleäre Zellen (Lymphocyten und Monozyten) darüber eine Bande bilden und sich an der Grenzschicht sammeln. Diese Interphase-Schicht wurde geerntet und anschließend für 10 min bei 550 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und für 7 min bei 550 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, das Pellet anschließend in 5 ml RPMI-Medium, dem 10% FKS, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nichtessenzielle Aminosäuren sowie 100 U/ml Pen/Strep zugegeben wurden, resuspendiert und die Zellen gezählt (siehe 3.6.3). Bei größerer Verunreinigung mit Thrombozyten erfolgten ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 500 x g sowie eine erneute Zellzählung. Die PBMC wurden anschließend in Kultur genommen oder direkt für Infektionsexperimente oder FACS-Analysen verwendet.

#### **3.6.7.2 Isolierung von feline Monozyten mittels Plastikadhärenz**

Die Isolierung von Monozyten erfolgte mit Hilfe der Plastikadhärenz. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  PBMC/ml RPMI-Medium in 48-Loch-Platten ausgesät und für zwei Stunden bei 37°C kultiviert. Von den mononukleären Zellen adhäreren hauptsächlich die Monozyten an die Oberfläche der Zellkulturplatte. Lymphocyten befinden sich in Suspension und wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS abgespült. Das Waschen mit PBS wurde zwei- bis dreimal wiederholt und die Monozyten mit RPMI-Medium versorgt. Anschließend wurden sie in Infektionsexperimenten eingesetzt.

#### **3.6.7.3 Isolierung von feline CD13- und CD14-positiven Zellen**

Die Isolierung von feline CD13-exprimierenden Zellen aus einer PBMC-Suspension erfolgte mit dem Kit „MACS Anti-Biotin MicroBeads“ von Miltenyi Biotec nach Angaben des Herstellers. Zuvor wurden PBMC wie in 3.6.7.1 beschrieben isoliert, für 6 min bei 500 x g pelletiert und in 80  $\mu$ l MACS Puffer resuspendiert. Zu den Zellen wurde ein muriner anti-CD13-Antikörper, Biotin konjugiert gegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu dem Ansatz 5 ml MACS Puffer hinzupipettiert und für 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80  $\mu$ l

MACS-Puffer resuspendiert, mit 20 µl MACS anti-Biotin MicroBeads versehen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer gewaschen, für 10 min bei 500 x g abzentrifugiert und auf die vorbereiteten Säulen, die sich in einem magnetischen Feld des MACS-Separators befanden, gegeben.

Mit dem Kit „MACS CD14 MicroBeads“ von Miltenyi Biotec erfolgte die Isolierung von feline CD14-positiven Zellen aus der PBMC-Suspension nach Angaben des Herstellers. PBMC wurden auch hier wie in 3.6.7.1 beschrieben isoliert, für 6 min bei 500 x g pelletiert und  $10^7$  Zellen in je 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden pro  $10^7$  Zellen 20 µl anti-CD14 MicroBeads hinzupipettiert, der Ansatz vorsichtig geschwenkt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen, für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und ebenfalls auf die vorbereiteten Säulen, die sich in einem magnetischen Feld des MACS-Separators befanden, gegeben.

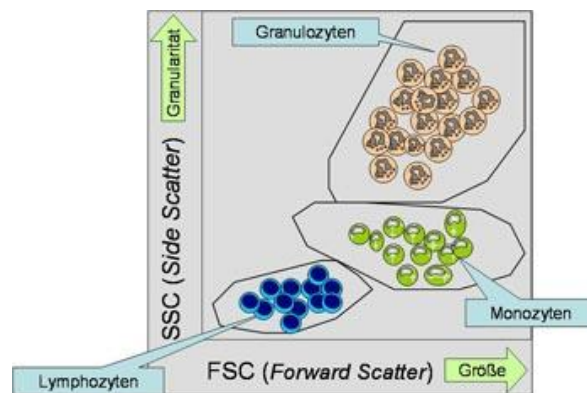
Die Isolierung der gewünschten Zellen beruhte auf ihrer magnetischen Markierung mit den anti-Biotin MicroBeads oder mit den anti-CD14 MicroBeads, wodurch sie in der Säule zurückgehalten wurden, während die unmarkierten Zellen durchflossen. Sobald die Säule nach dreimaligem Waschen mit 3 ml MACS-Puffer aus dem magnetischen Feld entfernt wurde, konnten die magnetisch zurückgehaltenen Zellen mit 500 µl MACS-Puffer als positiv selektierte Fraktion eluiert werden. Diese Fraktion wurde mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen, für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und in Infektionsexperimenten sowie FACS-Analysen eingesetzt.

### **3.6.8 Zellanalyse**

#### **3.6.8.1 Fluoreszenzzytometrie**

Für die quantitative Bestimmung und die Untersuchung der physikalischen und molekularen Eigenschaften von verschiedenen Zell-Subpopulationen wurde ein fluoreszenzaktivierter Zellsorter (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) verwendet. Grundlage der Fluoreszenzzytometrie ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern nachgewiesen wird. Bei der Messung werden die Zellen unter Druckluft durch eine Stahlkapillare gedrückt, wodurch ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelter Zellen in bestimmten

Abständen entsteht. Alle Tropfen gelangen in eine Messkammer, in der sie einen fokussierten Laserstrahl passieren. Dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die gebundenen Farbstoffe werden zur Fluoreszenz angeregt. Photodetektoren messen zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore. Die Lichtstreuung liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zelle. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die glatten B- oder T-Zellen. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut; der größte Teil der Streuung erfolgt entlang des einfallenden Lichtstrahls nach vorne, es wird daher als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet und dient zur Analyse der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits ungefärbt recht gut unterscheiden (Abb. 3.1).



<http://www.antikoerper-online.de/resources/17/607/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>

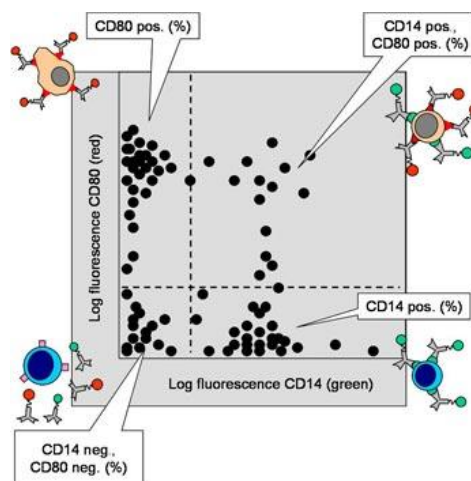
**Abb. 3.1: Schematische Darstellung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung**

Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Granuläre Zellen befinden sich oben. Große Zellen mit hoher Granularität (z.B. Granulozyten) sind demnach rechts oben zu finden, während kleinere, glatte Zellen links unten angezeigt werden.

Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der markierten monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung; CD = *cluster of differentiation*) in jeder Zelle.



Die erhaltenen Messergebnisse werden anschließend mit Hilfe der Gerätesoftware graphisch dargestellt. Bei der Datenauswertung können Zellen, die bei einer Parameterkombination in einem definierten Wertebereich liegen, durch Setzen eines Filters (*Gate*) selektiv zur Auswertung kommen. So werden z.B. Lymphozyten anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht erkannt und elektronisch ausgefiltert. Eine genauere Diskriminierung wird möglich, wenn mehrere Filter gleichzeitig angewendet und Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften miteinander korreliert werden. Werden die Zellen mit mehreren Antikörpern gefärbt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, wird die Fluoreszenz eines Antikörpers gegen die eines zweiten aufgetragen (siehe Abb. 3.2). Voraussetzung dafür ist, dass sich die Emissionsspektren der eingesetzten Fluorophore deutlich voneinander unterscheiden.



<http://www.antikoerper-online.de/resources/17/607/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>

**Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Dot Plots für CD14<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellen**

CD14-positive Zellen sind unten rechts und CD80-positive Zellen sind oben links angesiedelt. Im oberen rechten Teil der Abbildung sind Zellen, die für beide Marker positiv sind. Zellen, die für beide Marker negativ sind, befinden sich unten links. Die Fluoreszenzintensität nimmt von links nach rechts (x-Achse) bzw. von unten nach oben (y-Achse) zu.

### 3.6.8.2 Zellfärbung

Für die Analyse von PBMC im peripheren Blut von verschiedenen *specific pathogen free* (SPF)-Katzen mittels Sechskanal-Fluoreszenzzytometrie wurden die mononukleären Blutzellen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-, Allophycocyanin

(APC)-, Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)- oder Biotin-markierten monoklonalen Antikörpern (mAbs) gefärbt. Der Nachweis der Biotin-markierten mAbs erfolgte über Streptavidin-Phycoerythrin-Cyanin 7 (SA-PC7). Die verwendeten Antikörper und ihre Markierung sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Antikörper und ihrer Markierung**

<b>Antikörper</b>	<b>Markierung</b>
anti-CD5	FITC
anti-B220	PerCP
anti-CD13	APC
anti-CD14	Biotin (Nachweis über SA-PC7)

Für die Färbung wurden ca. 500 000 Zellen eingesetzt. Diese wurden mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und für 6 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die markierten Antikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten ein erneuter Waschschritt der Zellen mit 2 ml MACS-Puffer und eine Zentrifugation für 6 min bei 500 x g. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert und für die FACS-Analyse verwendet.

### **3.6.8.3 Fluoreszenzzytometrische Analyse der isolierten Zellen**

Es wurden jeweils mindestens 50 000 Zellen fluoreszenzzytometrisch analysiert. Die Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm CellQuest software von BD Bioscience und wurde von Dr. Reinhard Maier im Kantonspital St. Gallen durchgeführt. Anhand charakteristischer Eigenschaften im Vorwärts-/Seitwärts-Streulicht wurden zunächst das Lymphozyten- und das Monozyten-Gate definiert. Dies ermöglichte eine selektive Untersuchung der verschiedenen Zellpopulationen. Anhand der Fluoreszenzeigenschaften wurde ermittelt, welche Zellen positiv für bestimmte Oberflächenproteine sind.

### 3.7 Arbeiten mit Viren

#### 3.7.1 Titerbestimmung

Für die Bestimmung des Titors von Wildtyp- und rekombinanten Viren in *plaque forming units* pro ml (PFU/ml) wurden FCWF-4-Zellen in eine 12-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Medium ohne FKS gewaschen. Von der zu titrierenden Viruslösung wurde eine Verdünnungsreihe in  $\log_{10}$ -Stufen in Medium ohne FKS angelegt. Je 1 ml einer Verdünnungsstufe wurde in jedes Loch der 12-Loch-Platte überführt (2-fach Bestimmung). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde das virushaltige Medium abpipettiert, die Zellen mit Carboxymethylcellulose (CMC)-Medium-Mischung überschichtet und für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten die Auszählung der Plaques und die Bestimmung der Titer der Viruslösung in PFU/ml.

#### 3.7.2 Wachstumskurven

Für die Aufnahme einer Wachstumskurve wurden FCWF-4-Zellen in einer 24-Loch-Platte mit einer bestimmten MOI infiziert (siehe Kapitel 3.6.5). Die Überstände wurden je nach Virus in einem Zeitraum von bis zu 60 h alle 6-12 h geerntet, der Virustiter mit Hilfe einer Virustitration (siehe Kapitel 3.7.1) bestimmt und in seinem Verlauf graphisch dargestellt.

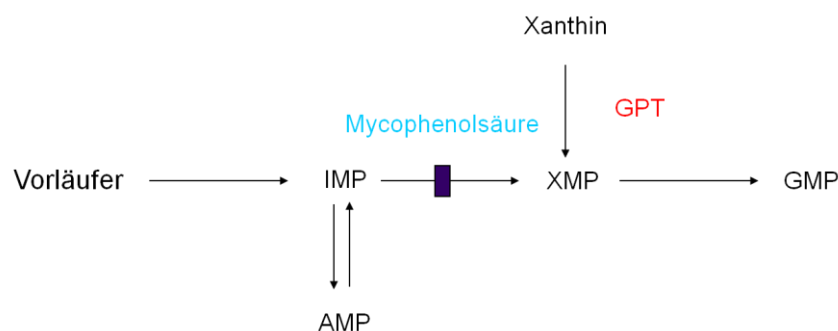
#### 3.7.3 Selektion von rekombinanten Vaccinia Viren

Für die Isolierung rekombinanter Vaccinia Viren wurde das GPT-Gen (Guanin-Phosphoribosyltransferase) von *E.coli* als Selektionsmarker sowohl für die Positiv- (Mulligan und Berg, 1981; Falkner und Moss, 1988) als auch für die Negativselektion (Isaacs et al., 1990) verwendet.

##### 3.7.3.1 Positivselektion

Für die Positivselektion wurden CV-1-Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia Virus infiziert und mit einem Plasmid, das FCoV-Sequenzen *upstream* und *downstream* des GPT-Gens enthält, transfiziert (siehe Kapitel 3.6.6.2). Bei der Replikation des

Vaccinia Virus in Gegenwart des Plasmids kann es zur Rekombination zwischen homologen Abschnitten der beiden DNA-Moleküle kommen. Bei einem Doppel-Crossover wird das GPT-Gen in das Genom des Vaccinia Virus integriert und gleichzeitig ein FCoV-Sequenzbereich deletiert, der über die Wahl der FCoV-flankierenden Sequenzen im Plasmid vorgegeben war. Die Selektion dieser rekombinanten Vaccinia Virus Zwischen-Klone erfolgte auf CV-1-Zellen in 6-Loch-Platten. Nach Zugabe eines Selektionsmediums, das 25 µg/ml Mycophenolsäure (*mycophenolic acid*, MPA), 250 µg/ml Xanthin (X) und 15 µg/ml Hypoxanthin (HyX) enthielt, wurden die Zellen für 5-6 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit 15 µl des Vaccinia Virus Klons infiziert. MPA ist ein Inhibitor des Purinmetabolismus und blockiert reversibel die Replikation von Vaccinia Viren. Diese Blockierung kann durch die Expression des GPT-Gens aufgehoben werden (Abb. 3.3). Nur rekombinante Vaccinia Viren, die das GPT-Gen integriert haben, können sich replizieren und bilden nach 48 h Inkubation Plaques, die im Lichtmikroskop sichtbar sind. Diese wurden mit Pipettenspitzen mechanisch abgelöst und in 120 µl Medium aufgenommen. Vor Einsatz dieser Virus-infizierten Zellen für eine neue Runde der Plaquereinigung wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Ultraschallbad aufgetaut. Die Anzahl der Plaquereinigungen belief sich auf 3-4 Runden.



**Abb. 3.3: Prinzip der Positivselektion**

MPA ist ein Inhibitor des Purinmetabolismus. Es inhibiert das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, das Inosin-Monophosphat (IMP) in Xanthinmonophosphat (XMP) umwandelt. Die Replikation von Vaccinia Viren wird blockiert, da kein Guaninmonophosphat (GMP) gebildet werden kann. Das GPT-Gen kodiert für das Enzym Guanin-Phosphoribosyltransferase (GPT), das Xanthin (X) zu XMP umwandeln kann und die Blockierung der Purinsynthese aufhebt.

### 3.7.3.2 Negativselektion

Bei der Negativselektion wurden CV-1-Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia Virus Zwischen-Klon infiziert und gleichzeitig mit einem Plasmid, das FCoV-Sequenzen *upstream* und *downstream* von einer gewünschten Sequenz enthält, transfiziert (siehe Kapitel 3.6.6.2). Infolge einer homologen Rekombination zwischen den FCoV-spezifischen Sequenzen wurde die Sequenz des GPT-Gens ersetzt. Die Selektion des entstandenen Vaccinia Virus End-Klons erfolgte auf D98OR-Zellen in einer 6-Loch-Platte. Nach Zugabe eines Selektionsmediums, das 1 µg/ml 6-Thioguanin (6-TG) enthielt, wurden die Zellen für 5-6 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit 15 µl des Vaccinia Virus Klons infiziert. 6-TG ist ein toxisches Nukleotidanalogen, das bei Vorhandensein des GPT-Gens zu 6-Thioguaninmonophosphat (6-TGMP) phosphoribosyliert und in die genomische DNA eingebaut wird. Hier wirkt es als „falsches“ Nukleotid und interferiert mit der DNA-Replikation. Die Synthese und Verwertung der Purin-Nukleotide wird inhibiert und der Zellzyklus gestört, was letztlich zum Zelltod führt. Nur rekombinante Vaccinia Viren, die das GPT-Gen durch die gewünschten FCoV-Sequenzen ersetzt haben, können sich replizieren und bilden nach 48 h Inkubation Plaques. Diese werden mit Pipettenspitzen mechanisch abgelöst und in 120 µl Medium aufgenommen. Vor Einsatz der virusinfizierten Zellen für eine neue Runde der Plaquereinigung wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Ultraschallbad aufgetaut. Die Anzahl der Plaquereinigungen belief sich auf 3-4 Runden. Ein rekombinanter Vaccinia Virus End-Klon, der die gewünschten FCoV-Sequenzen besaß, wurde in BHK-21-Zellen vermehrt und die rekombinante Vaccinia Virus DNA in präparativem Maßstab isoliert (siehe Kapitel 3.1.4.4).

### 3.7.4 Herstellung von rekombinanten Viren

Die Herstellung rekombinanter FCoVs beruhte auf der genetischen Manipulation des rekombinanten Vaccinia Virus, das die komplette cDNA-Kopie des Genoms von Serotyp I FCoV, Stamm Black enthielt (vrekFCoV Black) (Tekes, 2008b). Unter Nutzung der homologen Rekombination wurden gezielt Mutationen in dieses rekombinante Vaccinia Virus eingeführt. Die DNA-Abschnitte, an denen die homologe Rekombination zwischen eingebrachter Plasmid-DNA und dem Vaccinia Virus Genom stattfand, besaßen eine Länge von 200-500 bp. Am 5'-Ende der

rekombinanten FCoV-cDNA-Sequenz befand sich ein T7-Promotor, der für die *in vitro* Synthese der genomlangen FCoV-RNA mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase essenziell war. Die für die *in vitro* Transkription verwendete Vaccinia Virus DNA wurde aus vrekFCoV-infizierten BHK-21-Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.1.4.4), aufgereinigt (siehe Kapitel 3.1.3.1) und anschließend an ihrem 3'-Ende mit dem Restriktionsenzym *Clal* gespalten, um eine *in vitro* transkribierte FCoV-RNA mit exakt definiertem 3'-Ende zu erhalten. Diese RNA wurde anschließend in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 3.6.6.2), wo sie einen kompletten Replikationszyklus initiierte, der zur Freisetzung infektiöser Coronaviren führte. Die Herstellung von rekombinanten FCoVs erfolgte durch Vaccinia Virus vermittelter homologen Rekombination, bei der das GPT-Gen als Selektionsmarker diente (Positiv- und Negativselektion, siehe Kapitel 3.7.3.1 und 3.7.3.2). So wurde vorab ein rekombinantes Vaccinia Virus hergestellt (vrekFCoV Δ1b, S, 3abc), das bereits den Großteil des ORFs 1b (3'-Bereich) sowie die Gene S und 3abc von dem Serotyp II FIPV Stamm 79-1146 enthielt und für die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FCoV 79-1146 zur Verfügung stand. Die Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die hergestellten rekombinanten FCoVs sowie über die verwendeten rekombinanten Vaccinia Virus Klone und die substituierten Gene. In Tabelle 3.4 sind alle verwendeten Plasmide für die Positiv- und Negativselektionen aufgeführt.

**Tab. 3.3: Übersicht über die hergestellten rekombinanten feline Coronaviren sowie die dazu verwendeten rekombinanten Vaccinia Viren und über die substituierten Gene**

<b>rekombinantes FCoV</b>	<b>Vaccinia Virus Klon</b>	<b>substituierte(s) Gen(e)</b>
rekFCoV Δ1b, 3'UTR	vrekFCoV Δ1b, S, 3abc	E, M, N, 7ab, 3'UTR
rekFCoV 79-1146	vrekFCoV Δ1b, 3'UTR	1a, 5'-terminales Ende von 1b
rekFCoV Black Δ3abc, FCV	vrekFCoV Black	3abc
rekFCoV Black Δ7ab, FCV	vrekFCoV Black	7ab
rekFCoV 79-1146, GFP	vrekFCoV 79-1146	3abc
rekFCoV 79-1146 Δ3c, Stop	vrekFCoV 79-1146	3c
rekFCoV 79-1146 ΔS	vrekFCoV 79-1146	S
rekFCoV 79-1146 Δ3c, Stop; ΔS	vrekFCoV 79-1146 Δ3c, Stop	S

**Tab. 3.4: Übersicht über die verwendeten Plasmide für die Positiv- und Negativselektionen sowie die Vektoren, die den hergestellten Plasmiden zugrunde liegen und die Sequenzen, die in den Vektor kloniert wurden**

<b>Plasmid</b>	<b>Vektor</b>	<b>Sequenz</b>
pGPT 556-1	pGPT-1	FCoV 79-1146 + Vaccinia Virus nt 25200-25800, nt 29080-VV L1
pB (+) 4-3	pBluescript II SK (+)	FCoV 79-1146 nt 25200-29355
pGPT 35-5	pGPT-1	FCoV 79-1146 + Vaccinia Virus VVR1-nt 25 nt 13251-13750
pGemT 55-1	pGemT	FCoV 79-1146 + Vaccinia Virus VV R1-nt 2230 nt 11200-13250
pGPT 148-6	pGPT-1	FCoV 79-1146 nt 2230-4230 nt 9930-11200
pGemT 52-1	pGemT	FCoV 79-1146 nt 7630-10450
pGemT 66-7	pGemT	FCoV 79-1146 nt 5590-10450
pGemT 71-6	pGemT	FCoV 79-1146 nt 3730-10450
pGPT 245-3	pGPT-1	FCoV 79-1146 nt 25000-25365 nt 25670-26075
pGPT 374-1	pGPT-1	FCoV 79-1146 nt 21710-22075 nt 22825-23175
pGemT 235-10	pGemT	FCoV 79-1146 nt 25000-26075
pGemT 370-2	pGemT	FCoV 79-1146 nt 21710-23175
pGPT 159-3	pGPT-1	FCoV 79-1146 nt 24303-24795 nt 25880-26380
pGemT 277-4-1	pGemT	pEGFP nt 1-720 FCoV 79-1146 nt 24303-24840 nt 25850-26380
pGemT 438-7	pGemT	FCV 2024 nt 5683-7637 FCoV Black nt 24224-24823 nt 25755-26378

pGemt 438-11	pGemT	FCV 2024 nt 5683-7637 FCoV Black nt 27333-28029 nt 28920-29228
--------------	-------	--



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten feline Coronaviren

Die Entwicklung von revers-genetischen Systemen für Coronaviren, basierend auf genomlangen cDNA-Klonen, ermöglicht gezielte Veränderungen des gesamten coronaviralen Genoms und somit die Herstellung von rekombinanten Viren mit inaktivierten, deletierten oder modifizierten Genen (Thiel und Siddell, 2005). Für die Herstellung und Untersuchung von rekombinanten feline Coronaviren, u.a. im Hinblick auf die Pathogenese der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP), wurde im Jahr 2008 ein revers-genetisches System für feline Coronaviren etabliert, das auf der Klonierung der genomlangen cDNA des Serotyp I feline Coronavirus Stamm Black in einen Vaccinia Virus Vektor basiert (Tekes et al., 2008a). In Tierversuchen wurde Avirulenz des hergestellten rekombinanten feline Coronavirus Stamm Black nachgewiesen (Tekes und Spies et al., 2012). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das System gezielt für die Herstellung einer virulenten Variante des feline Coronavirus verwendet. Dafür wurden die Sequenzen der gesamten Gene sowie der nichttranslatierten Regionen des Serotyp I FCoV Stamm Black in mehreren Schritten durch die korrespondierenden Gensequenzen des virulenten Serotyp II FIPV Stamm 79-1146 ausgetauscht. Es ist bekannt, dass der FIPV Stamm 79-1146 in Katzen FIP induziert (Rottier et al., 2005).

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FIPV stand ein rekombinantes Vaccinia Virus (vrekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc) zur Verfügung, das bereits den Großteil des ORFs 1b (3'-Bereich) sowie die Gene S und 3abc von dem Serotyp II FIPV Stamm 79-1146 enthielt (Abb. 4.1).

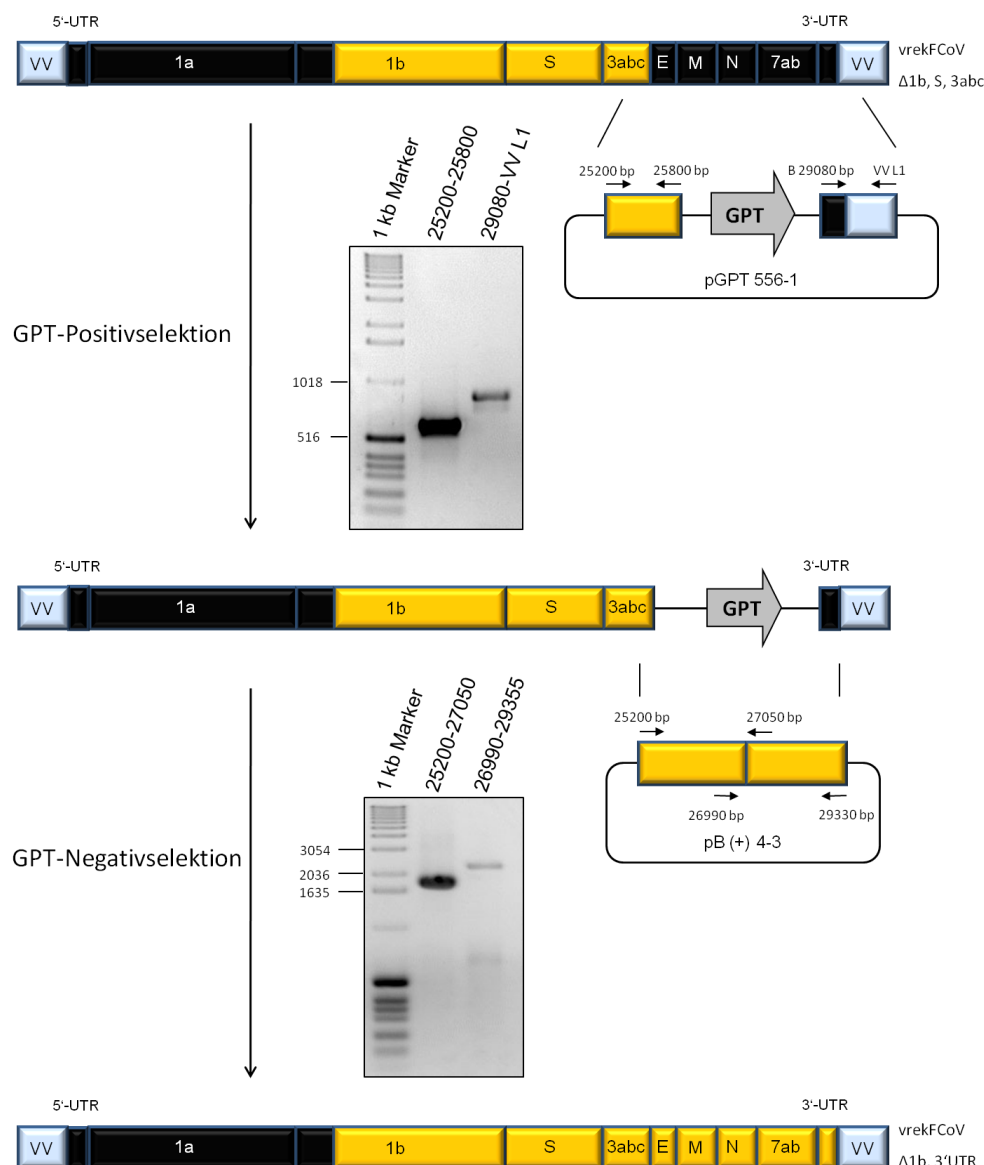


**Abb. 4.1: Schematische Darstellung des rekombinanten Vaccinia Virus vrekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc**

Als Ausgangsvirus für die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FCoV diente vrekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc. Dieses rekombinante Virus besitzt Gensequenzen beider Serotypen: ORF 1b (3'- Bereich) sowie die Gene S und 3abc wurden bereits durch Sequenzen von Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 (gelbe Boxen) ersetzt; die 5'-nichttranslatierte Region (5'-UTR), die ORFs 1a und 1b (5'-Bereich) sowie die Sequenzen der Gene E, M, N, 7ab und die 3'-nichttranslatierte Region (3'-UTR) stammten vom Serotyp I FCoV Stamm Black (schwarze Boxen). Die gesamte coronavirale cDNA ist integriert in den Vaccinia Virus (VV) Vektor (hellblaue Boxen).

#### 4.1.1 Herstellung von vrekFCoV $\Delta$ 1b, 3'UTR

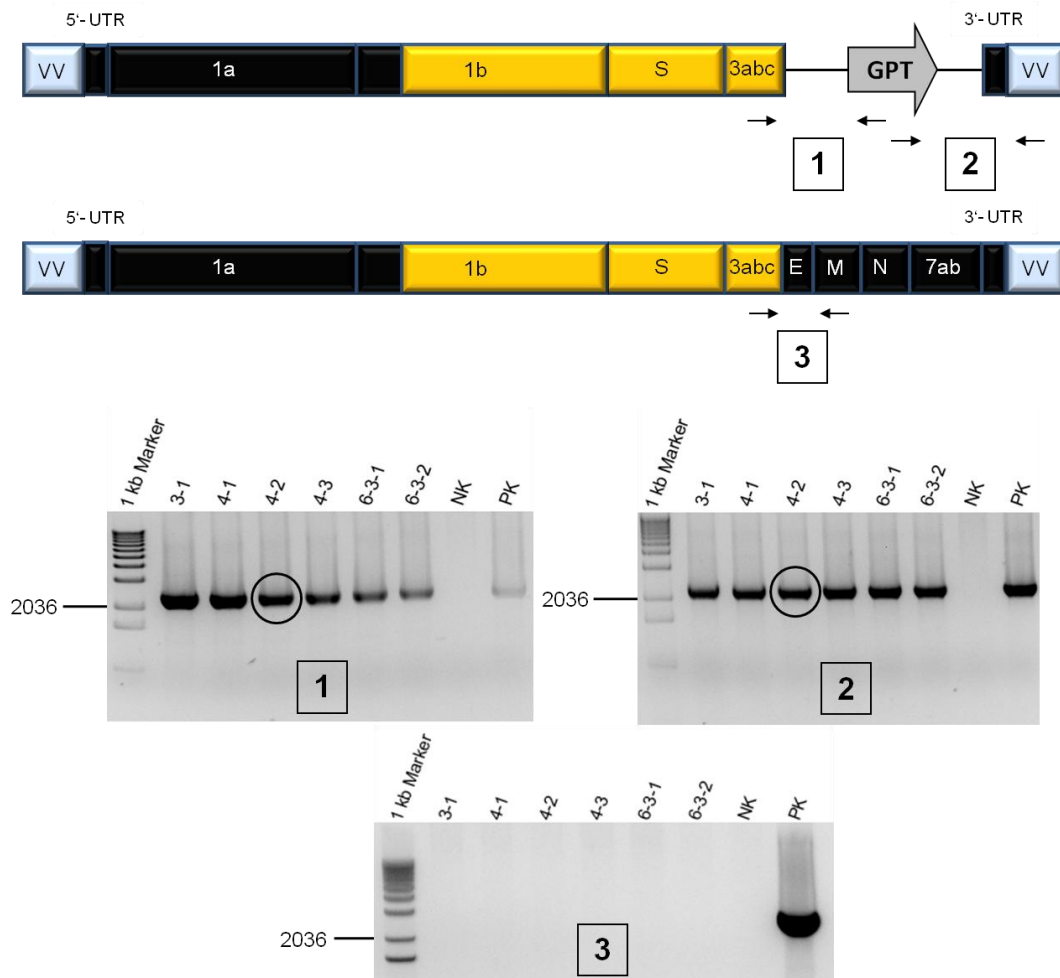
Der erste Schritt für die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FIPV bestand im Austausch des gesamten 3'-Endes, das die Gene E, M, N, 7ab sowie die 3'-nichttranslatierte Region betraf. Dieser Austausch erfolgte durch Vaccinia Virus vermittelter homologer Rekombination unter Verwendung des Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens (GPT) von *E. coli* als Positiv- und Negativselektionsmarker (siehe Kapitel 3.7.3) (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Herstellung von vrekFCoV  $\Delta$ 1b, 3'UTR**

Die Gene E, M, N, 7ab sowie die 3'-nichttranslatierte Region von dem avirulenten Serotyp I FCoV Stamm Black (schwarze Boxen) wurden mit Hilfe von Vaccinia Virus vermittelter homologer Rekombination in Verbindung mit GPT-Positiv- und Negativselektion durch die korrespondierenden Gensequenzen des virulenten Serotyp II FCoV Stamms 79-1146 (gelbe Boxen) ersetzt.

Zunächst wurden CV-1-Zellen mit dem Ausgangsvirus vrekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc infiziert und mit dem Plasmid pGPT 556-1 transfiziert. Das Plasmid basierte auf pGPT-1 (Hertzog et al., 2004), in das *upstream* des GPT-Gens die Serotyp II FCoV Sequenz nt 25200-25800 und *downstream* des GPT-Gens die Serotyp I FCoV bzw. Vaccinia Virus Sequenz nt 29080-VV L1 kloniert wurden. Die coronaviralen Sequenzen wurden zuvor mittels RT-PCR/ PCR amplifiziert (Primerpaare 79-25200-F-XhoI/ 79-25800-R-EcoRI, B-29080-F-BamHI/ VV L1) und anschließend in den bakteriellen Vektor pGemT kloniert. Unter Verwendung der Restriktionsstellen *XhoI/EcoRI* und *BamHI/SacI* wurden die DNA-Fragmente in den Vektor pGPT-1 umklont. Als Matrize für das PCR-Produkt (29080-VV L1) diente das rekombinante Vaccinia Virus vrekFCoV Black, das die genomlange cDNA des Serotyp I FCoV Stamm Black enthält. Für das RT-PCR-Produkt (25200-25800) wurde Poly-(A)-RNA als Matrize verwendet, die aus Zellen (siehe kapitel 3.4.1) nach Infektion mit dem Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 gewonnen wurde. Wenn das rekombinante Vaccinia Virus vrekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc in Gegenwart dieses Plasmids repliziert, kann es zu einer doppelten homologen Rekombination zwischen den homologen Abschnitten der DNA-Moleküle kommen, wodurch das *E. coli* Gen GPT und flankierende Sequenzen in das Vaccinia Virus Genom eingebaut werden. Nach drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Positivselektion (siehe Kapitel 3.7.3.1) wurden sechs rekombinante Vaccinia Virus Klone mittels PCR überprüft (Abb. 4.3).

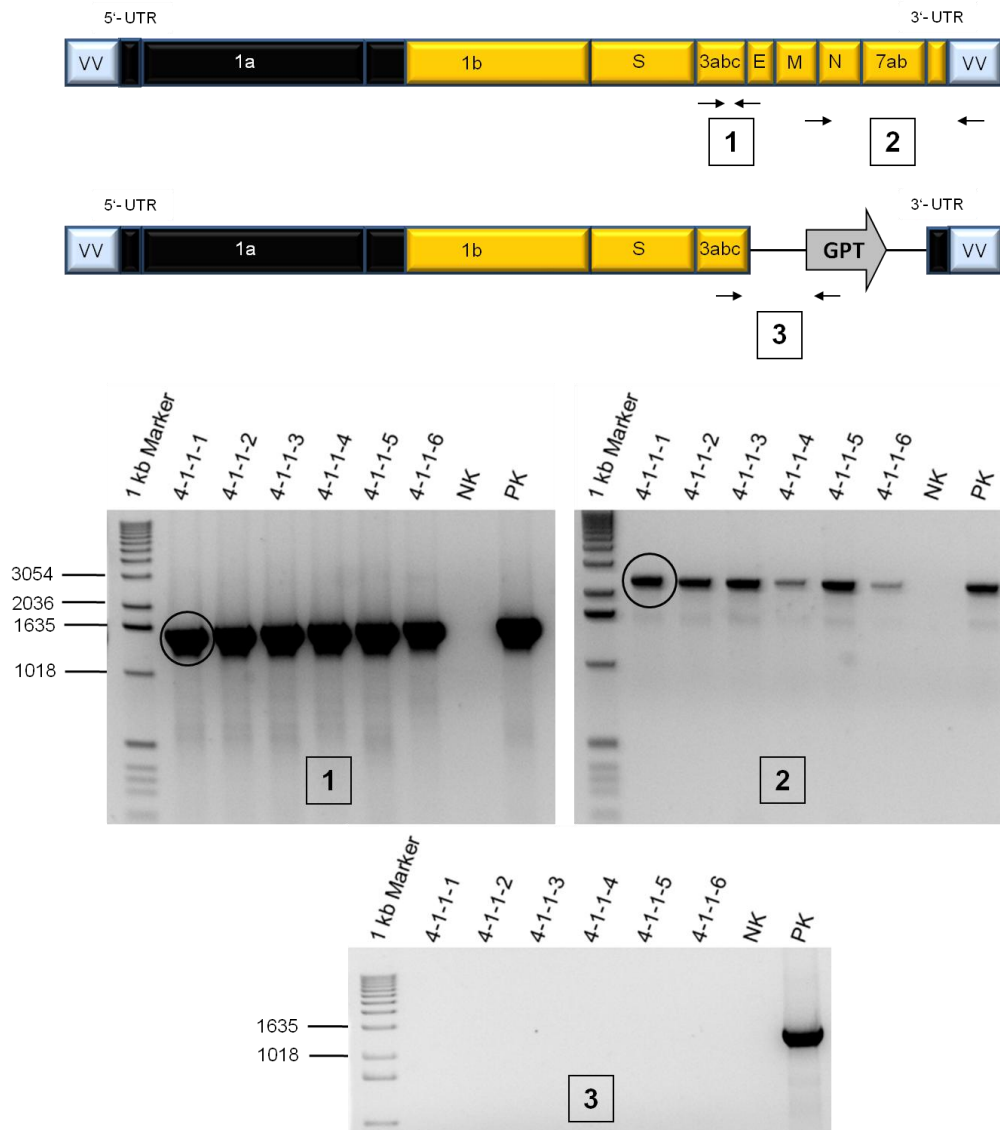


**Abb. 4.3: Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Positivselektion mittels PCR**

Zur Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die das Gen GPT an der gewünschten Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben, wurden bei sechs Vaccinia Virus Klonen (3-1, 4-1, 4-2, 4-3, 6-3-1, 6-3-2) je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine Negativkontrolle (NK) (basierend auf ddH<sub>2</sub>O) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt. PCR 1 (Primerpaar 79-24303-F-XhoI/ GPT-300as) und PCR 2 (Primerpaar GPT-250s/ VV L1) überprüften mit Primern, die in die GPT-Gensequenz reichen, ob das GPT-Gen vorhanden ist. PCR 3 (Primerpaar 79-24303-F-XhoI/ B-27250-rev) identifizierte rekombinante Vaccinia Viren, bei denen keine Rekombination stattgefunden hat und somit Serotyp I FCoV Sequenzen anstatt GPT beinhaltet. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für die Negativselektion eingesetzt wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

Die sechs getesteten rekombinanten Vaccinia Virus Klone haben das Gen GPT und die flankierenden Sequenzen an den gewünschten Positionen eingebaut. Bei PCR 1 zeigten alle eine erwartete Fragmentgröße von ca. 2,3 kb und bei PCR 2 von ca. 2,1 kb. PCR 3 war, wie erwartet, bei den sechs Klonen negativ.

In einem zweiten Schritt wurden CV-1-Zellen mit dem ausgewählten rekombinanten Vaccinia Virus Klon 4-2 infiziert und mit dem Plasmid pB(+) 4-3 transfiziert (siehe Abb. 4.4). Das Plasmid beruhte auf pBluescript II SK (+), das die Serotyp II FCoV Sequenz nt 25200-29355 enthielt. Das Insert mit der Sequenzlänge von ca. 4 kb basierte auf zwei sich überlappenden RT-PCR-Produkten (Primerpaare 79-25200-F-XhoI/79-27050-R, 79-26990-F-SacII/79-29330-R-SacI). Als Matrize diente die aus FCoV Stamm 79-1146 infizierten Zellen gewonnene Poly-(A)-RNA. Während die Klonierung des RT-PCR-Produktes nt 25200-27050 direkt in das Plasmid pBluescript II SK (+) erfolgte, wurde das RT-PCR-Produkt nt 26990-29355 zuerst in den pGemT Vektor ligiert und anschließend über die Schnittstellen *MscI* und *SacI* in den pBluescript II SK (+) Vektor umklont. Da das Restriktionsenzym *MscI* in der Serotyp II FCoV Sequenz an Position nt 27018 schneidet, konnten die beiden Fragmente gut miteinander ligiert werden. Nach einer erfolgreichen Vaccinia Virus vermittelten doppelten homologen Rekombination wurden die Serotyp II FCoV Sequenzen in das Vaccinia Virus Genom eingebaut. Mit Hilfe der PCR konnten nach drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Negativselektion (siehe Kapitel 3.7.3.2) erneut sechs rekombinante Vaccinia Virus Klone, bei denen die homologe Rekombination an der erwarteten Position stattgefunden hat, identifiziert werden (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Negativselektion mittels PCR**

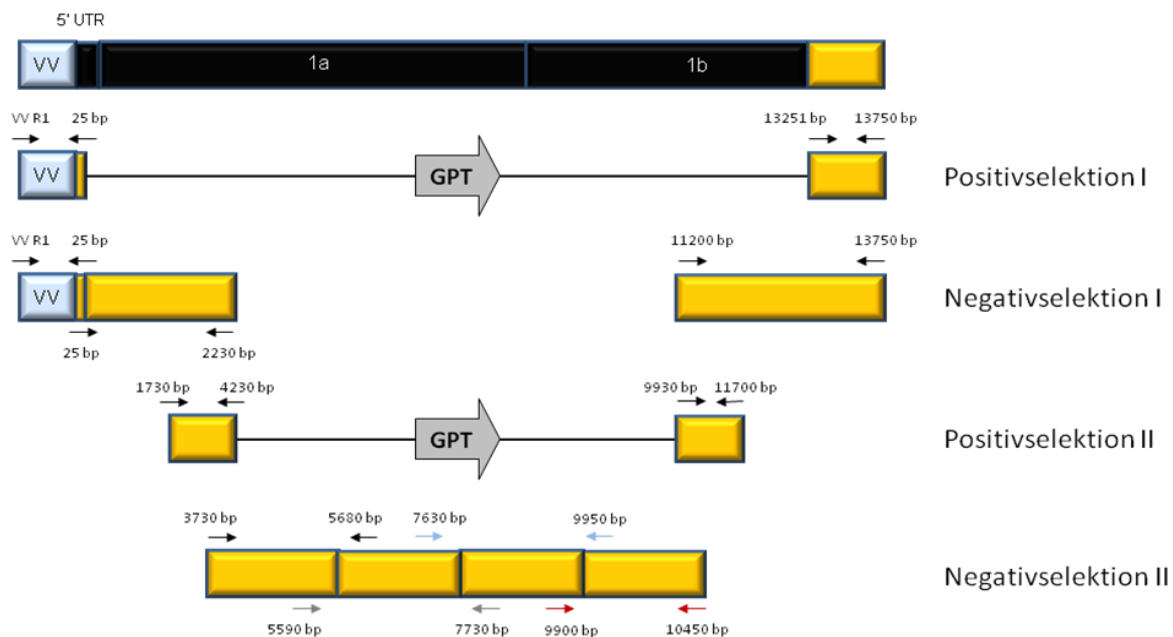
Für die Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die die Serotyp II FCoV Sequenz durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut haben, wurden bei sechs Klonen (4-1-1-1, 4-1-1-2, 4-1-1-3, 4-1-1-4, 4-1-1-5, 4-1-1-6) erneut je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine NK und eine PK mitgeführt. PCR 1 (Primerpaar 79-24303-F-XhoI/ 79-25800-R-EcoRI) und PCR 2 (Primerpaar 79-26990-F-SacII/ VV L1) überprüften die Regionen, in denen die homologen Rekombinationen stattfinden sollten. PCR 3 (Primerpaar 79-24303-F-XhoI/ Gpt-300as) identifizierte rekombinante Vaccinia Viren, bei denen die Rekombination nicht stattfand und die somit das Gen GPT statt der gewünschten Serotyp II Sequenzen enthielten. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für weitere Versuche eingesetzt wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass die sechs getesteten rekombinanten Vaccinia Virus Klone die Serotyp II FCoV Sequenz nt 25200-29355 an der richtigen Position in

das Genom eingebaut haben. Die PCR-Produkte 1 und 2 wiesen jeweils die erwartete Bandengröße von ca. 1,5 kb bzw. 2,6 kb auf. PCR 3 ist bei allen Klonen negativ; somit enthält keiner der Klone das Gen GPT. Um zu überprüfen, ob Mutationen aufgetreten sind, wurde der Klon 4-1-1-1 (siehe Abb. 4.4 schwarzer Kreis) sequenziert und anschließend als Ausgangsvirus für die Herstellung des rekombinanten Vaccinia Virus vrekFCoV 79-1146 verwendet.

#### 4.1.2 Herstellung von vrekFCoV 79-1146

Das erfolgreich hergestellte rekombinante Vaccinia Virus vrekFCoV  $\Delta 1b$ , 3'UTR konnte direkt als Ausgangsvirus für den Austausch des ORF 1a, den 5'-Bereich des ORF 1b sowie der 5'-nichttranslatierten Region verwendet werden. Da der letzte zu ersetzende Sequenzbereich eine Größe von ca. 14 kb hatte, waren für den Austausch der Serotyp I FCoV Sequenzen je zwei Positiv- und Negativselektionen erforderlich (Abb. 4.5).

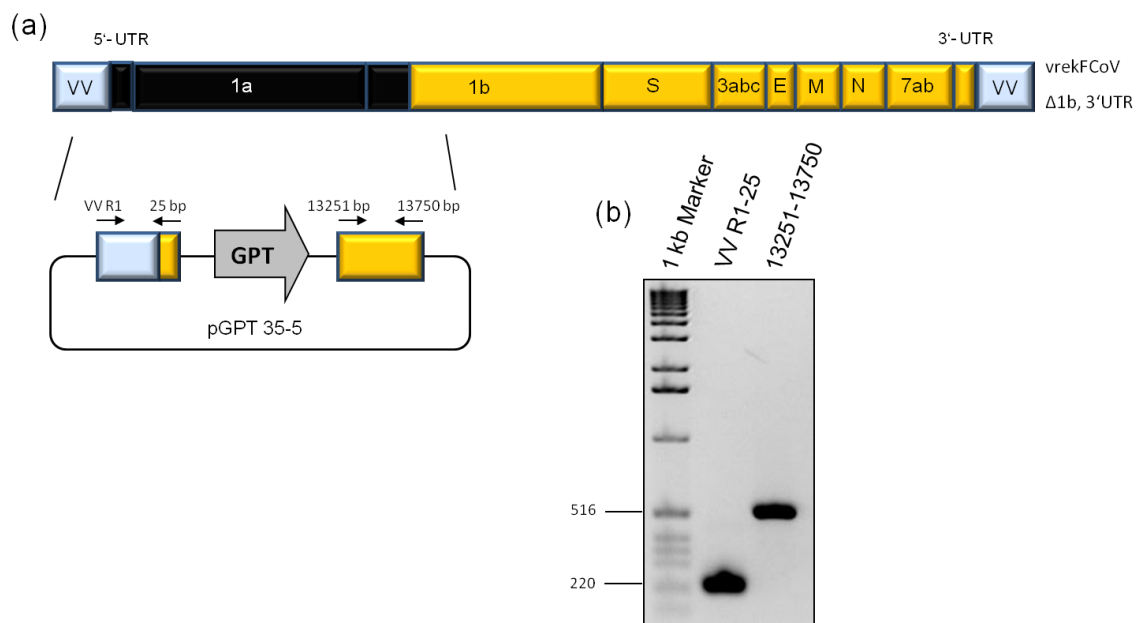


**Abb. 4.5: Übersicht über den schrittweisen Austausch des ORF 1a, 5'- Bereich des ORF 1b sowie der 5'- nichttranslatierten Region**

ORFs 1a und 1b (5'-Bereich) sowie die 5'-nichttranslatierte Region von Serotyp I FCoV Stamm Black wurden gegen die korrespondierenden Sequenzen von Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 mittels Vaccinia Virus vermittelter homologen Rekombination ausgetauscht. Aufgrund der Größe der auszutauschenden Sequenz von ca. 14 kb waren je zwei Positiv- und Negativselektionen notwendig.

#### 4.1.2.1 Positivselektion I

Im ersten Schritt wurde die verbliebene Serotyp I FCoV Stamm Black Sequenz nt 1-13250 durch das Gen GPT ersetzt (siehe Abb. 4.6 (a)). Dafür wurden CV-1-Zellen mit dem Ausgangsvirus vrekFCoV Δ1b, 3'UTR infiziert und mit dem Plasmid pGPT 35-5 transfiziert. Das Plasmid enthielt *upstream* des GPT-Gens sowohl Vaccinia Virus Sequenz als auch Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Sequenz (VV R1-25). *Downstream* des GPT-Gens befand sich die Serotyp II Sequenz nt 13251-13750. Diese Sequenzen wurden zuvor amplifiziert (Primerpaare VVR1-F-XhoI/79-25-R-SalI, 79-13251-F-BamHI/79-13750-R-SacI) (siehe Abb. 4.6 (b)) und jeweils in einen pGemT Vektor kloniert. Die Sequenz mehrerer Klone wurde überprüft und die Fragmente unter Verwendung der Schnittstellen *XhoI/SalI* und *BamHI/SacI* nacheinander in den pGpt-1 Vektor umkloniert.

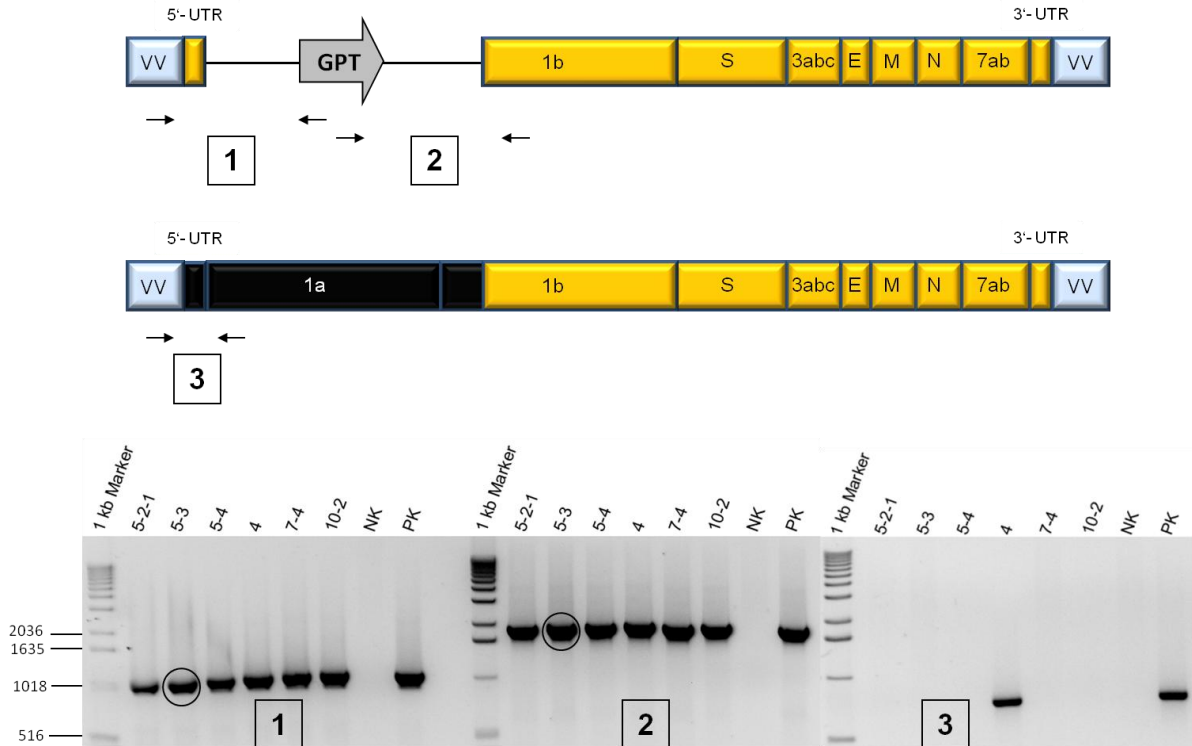


**Abb. 4.6: Schematische Darstellung der Positivselektion I**

(a) Die 5'-nichttranslatierte Region sowie der ORF 1a und der 5'-Bereich von ORF 1b von Serotyp I FCoV Stamm Black wurden mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination in Verbindung mit Positivselektion durch das *E. coli* Gen GPT ersetzt. (b) PCR- und RT-PCR-Produkt basierend auf den flankierenden Sequenzen der ausgetauschten Region, die *upstream* und *downstream* des GPT-Gens kloniert wurden. Als Matrize für das PCR-Produkt (VV R1-25) diente vrekFCoV Black; für das RT-PCR-Produkt (13251-13750) wurde FCoV Stamm 79-1146 als Matrize verwendet.



Nach drei Runden Plaquereinigung auf CV-1-Zellen unter GPT-Positivselektion wurden sechs rekombinante Vaccinia Virus Klone mittels PCR überprüft (siehe Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Positivselektion I mittels PCR**

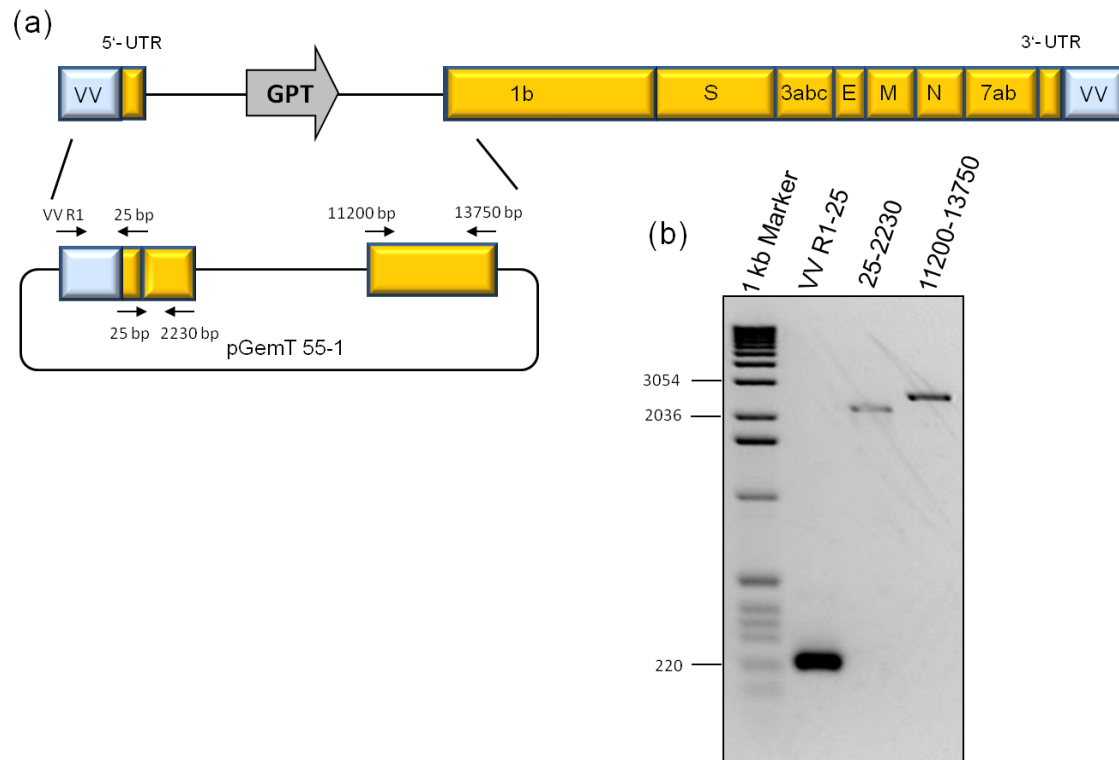
Zur Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die das Gen GPT an der gewünschten Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben, wurden bei sechs Vaccinia Virus Klonen (5-2-1, 5-3, 5-4, 4, 7-4, 10-2) je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine NK und eine PK mitgeführt. PCR 1: Primerpaar VV R1/ GPT-300as, PCR 2: Primerpaar GPT-250s/ 79-13750-F-XhoI, PCR 3: Primerpaar VV R1/ A-515-ex-rev. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für die Negativselektion I eingesetzt wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

Abbildung 4.7 zeigt, dass fünf von sechs getesteten rekombinanten Vaccinia Virus Klonen das Gen GPT nach doppelter homologen Rekombination an der richtigen Position eingebaut haben. Die PCR-Produkte von PCR 1 und 2 mit ca. 1,1 kb bzw. 1,9 kb wiesen bei den sechs Klonen die richtige Größe auf. In PCR 3 ist zu sehen, dass es sich bei Klon 4 um eine Mischung handelte, die sowohl rekombinante Vaccinia Viren mit GPT-Gen enthielt als auch solche, die die Serotyp I Sequenz

aufwiesen. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon 5-3 wurde anschließend in der Negativselektion I für die Infektion eingesetzt.

#### **4.1.2.2 Negativselektion I**

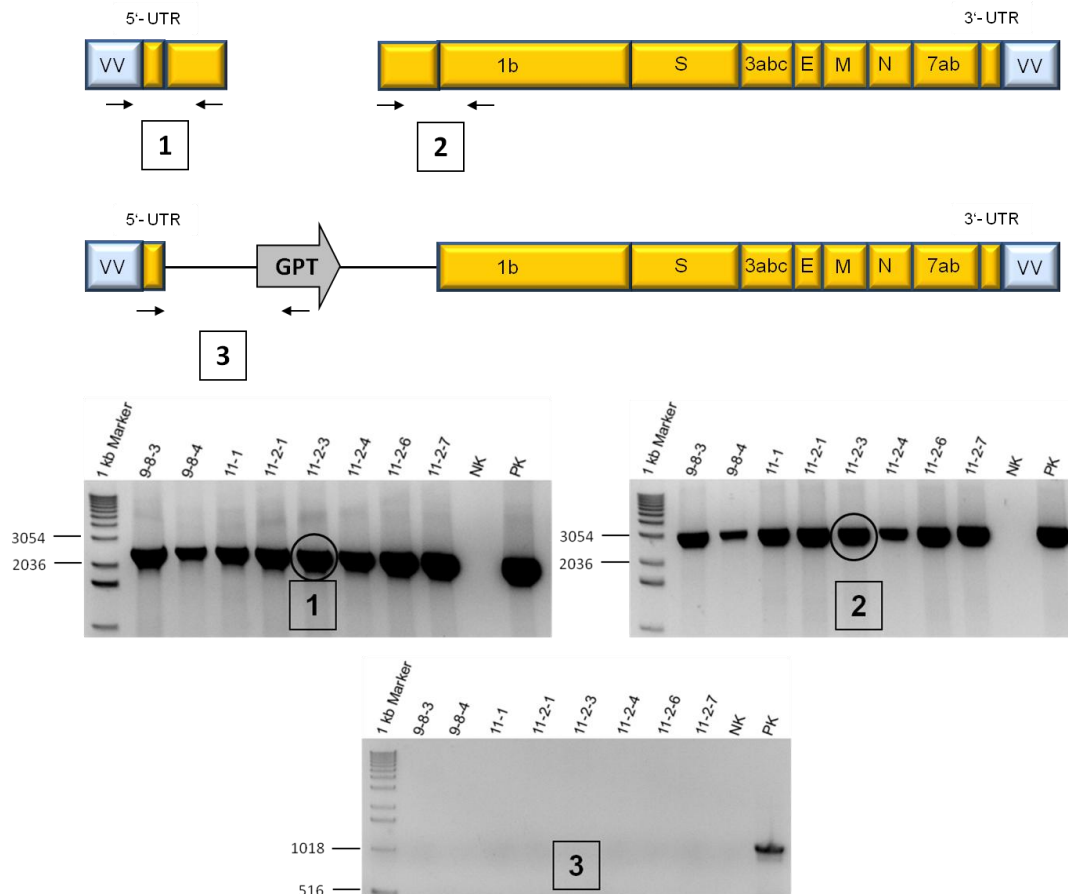
Im nächsten Schritt ersetzten die Serotyp II Sequenzen nt 25-2230 und nt 11200-13750 das GPT-Gen (siehe Abb. 4.8 (a)). Dafür wurden CV-1-Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia Virus Klon 5-3 infiziert und mit dem Plasmid pGemT 55-1 transfiziert. Das Plasmid umfasste das PCR-Produkt VV R1-25 basierend auf der Vaccinia Virus Sequenz sowie der Serotyp II Sequenz nt 1-25 (Primerpaar VV R1/79-25-R-Esp3I) und das RT-PCR-Produkt 25-2230 basierend auf der Serotyp II Sequenz nt 25-2230 (Primerpaar 79-25-F-Esp3I/79-2230-R-SacII). Zudem enthielt es das RT-PCR-Produkt 11200-13750, das auf der Serotyp II Sequenz nt 11200-13750 (Primerpaar 79-11200-F/79-13750-R-SalI) beruhte (siehe Abb. 4.8 (b)). Die Klonierung des PCR-Produktes VV R1-25 und des RT-PCR-Produktes 25-2230 erfolgte jeweils in einen pGemT Vektor. Das RT-PCR-Produkt 11200-13750 wurde in den Vektor pGemTeasy kloniert. Zunächst fand über die Schnittstellen *Esp3I* und *SacI* die Umklonierung des DNA-Fragmentes 25-2230 in den pGemT Vektor statt, der bereits das PCR-Produkt VV R1-25 enthielt. Anschließend wurde auch das dritte Fragment über die Schnittstellen *NotI* und *SalI* umkloniert. Unter Nutzung der Rekombination konnten die FCoV-Sequenzen anstelle des GPT-Gens in die coronavirale cDNA integriert werden.



**Abb. 4.8: Schematische Darstellung der Negativselektion I**

(a) Das Gen GPT wurde durch die Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Sequenzen nt 25-2230 und nt 11200-13250 mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination in Verbindung mit Negativselektion ausgetauscht. (b) Nachweis der PCR- und RT-PCR-Produkte, die nacheinander in den Vektor pGemT kloniert wurden. Als Matrize für das PCR-Produkt (VV R1-25) diente vrekFCoV Black; für die RT-PCR-Produkte (25-2230, 11200-13750) wurde FCoV Stamm 79-1146 als Matrize verwendet.

Acht rekombinante Vaccinia Virus Klone wurden nach drei Runden Plaquareinigung auf D98OR-Zellen unter GPT-Negativselektion isoliert und mittels PCR überprüft (siehe Abb. 4.9).



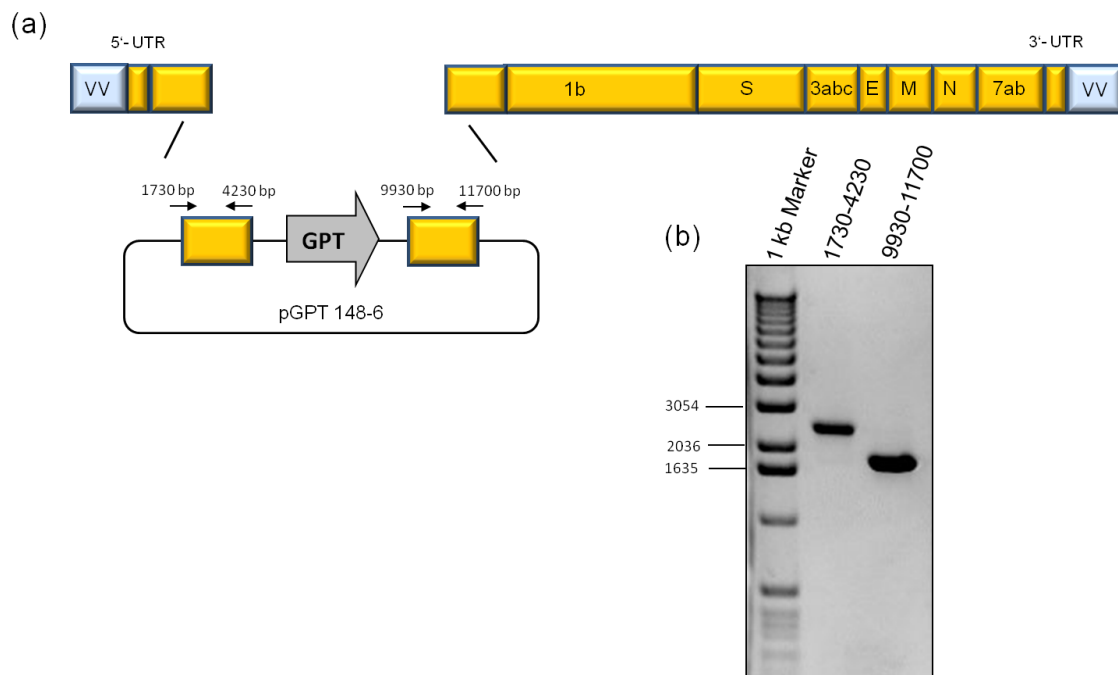
**Abb. 4.9 Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Negativselektion I mittels PCR**

Zur Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die die Serotyp II FCoV Sequenz durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut haben, wurden bei acht Vaccinia Virus Klonen (9-8-3, 9-8-4, 11-1, 11-2-1, 11-2-3, 11-2-4, 11-2-6, 11-2-7) je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine NK und eine PK mitgeführt. PCR 1: Primerpaar VV R1/ 79-2230-R-SacI, PCR 2: Primerpaar 79-11200-F/ 79-14220-R-XhoI, PCR 3: Primerpaar VV R1/ Gpt-300as. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für die Positivselektion II eingesetzt wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

Aus Abbildung 4.9 geht hervor, dass die acht getestete rekombinante Vaccinia Virus Klone die Serotyp II FCoV Sequenzen in das Genom an der gewünschten Position eingebaut haben. Die PCR-Produkte 1 und 2 besaßen jeweils die erwarteten Bandengrößen von ca. 2,5 kb bzw. 3 kb. PCR 3 war bei allen Klonen negativ; somit enthält keiner der Klone das Gen GPT. Für die Positivselektion II wurde der rekombinante Vaccinia Virus Klon 11-2-3 verwendet.

#### 4.1.2.3 Positivselektion II

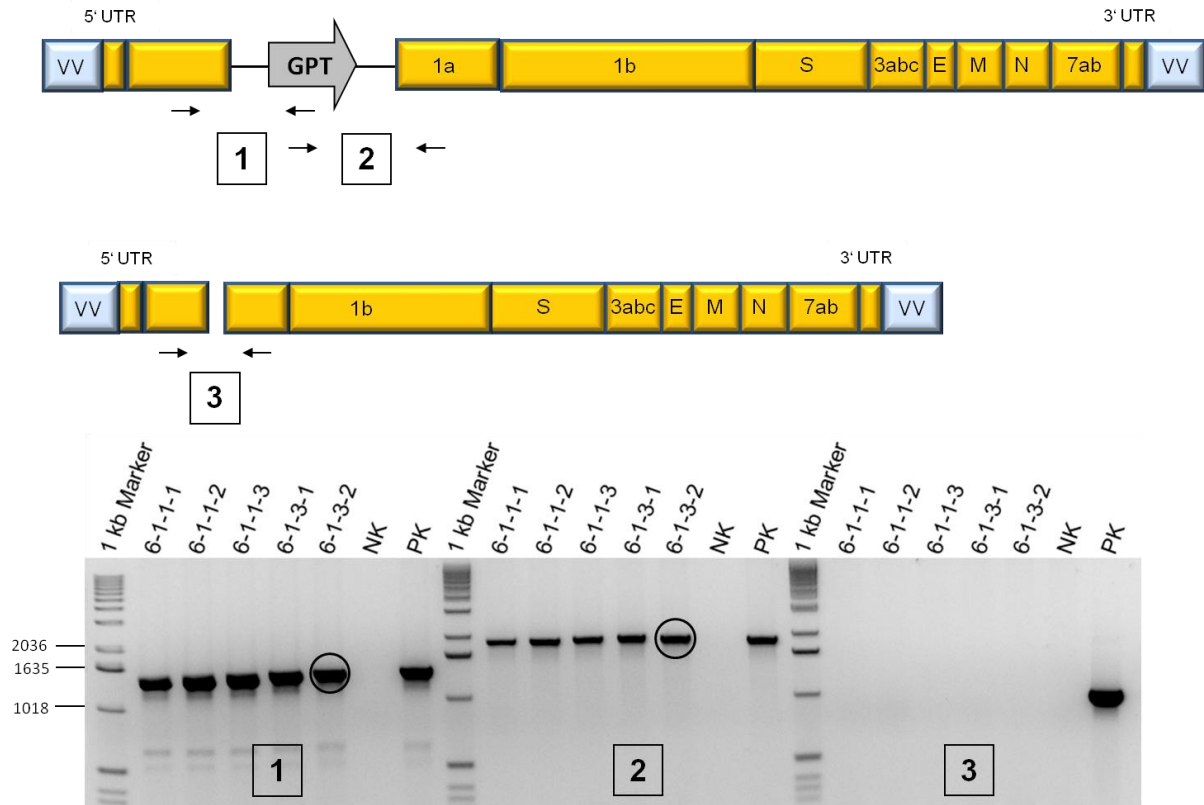
Bei der Positivselektion II wurde das Gen GPT zusammen mit den Serotyp II Sequenzen nt 1730-4230 und nt 9930-11700 in das rekombinante Vaccinia Virus Genom eingeführt (siehe Abb. 4.10 (a)). Das Plasmid pGPT 148-6, mit dem die infizierten CV-1-Zellen transfiziert wurden, enthielt *upstream* des GPT-Gens die Serotyp II FCoV Sequenz nt 1730-4230 und *downstream* die Serotyp II FCoV Sequenz nt 9930-11700. Unter Verwendung der Primerpaare 79-1730-F-XhoI/ 79-4230-R-XhoI und 79-9930-F-BamHI/ 79-11700-R-NotI wurden die coronaviralen Sequenzen zuvor mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend in den bakteriellen Vektor pGemT kloniert (siehe Abb. 4.10 (b)). Die Umklonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pGPT-1 fand mit Hilfe der Restriktionsstellen *XhoI* und *BamHI/NotI* statt.



**Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Positivselektion II**

(a) Mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination in Verbindung mit Positivselektion wurden das *E. coli* Gen GPT sowie die coronaviralen Serotyp II Sequenzen nt 1730-4230 und nt 9930-11700 in das rekombinante Vaccinia Virus Genom eingeführt. (b) RT-PCR-Produkte, die *upstream* und *downstream* des GPT-Gens kloniert wurden. Als Matrize für die RT-PCR-Produkte diente FCoV Stamm 79-1146.

Nach drei Runden Plaquereinigung auf CV-1-Zellen unter GPT-Positivselektion wurden fünf rekombinante Vaccinia Virus Klone mittels PCR überprüft (siehe Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Positivselektion II mittels PCR**

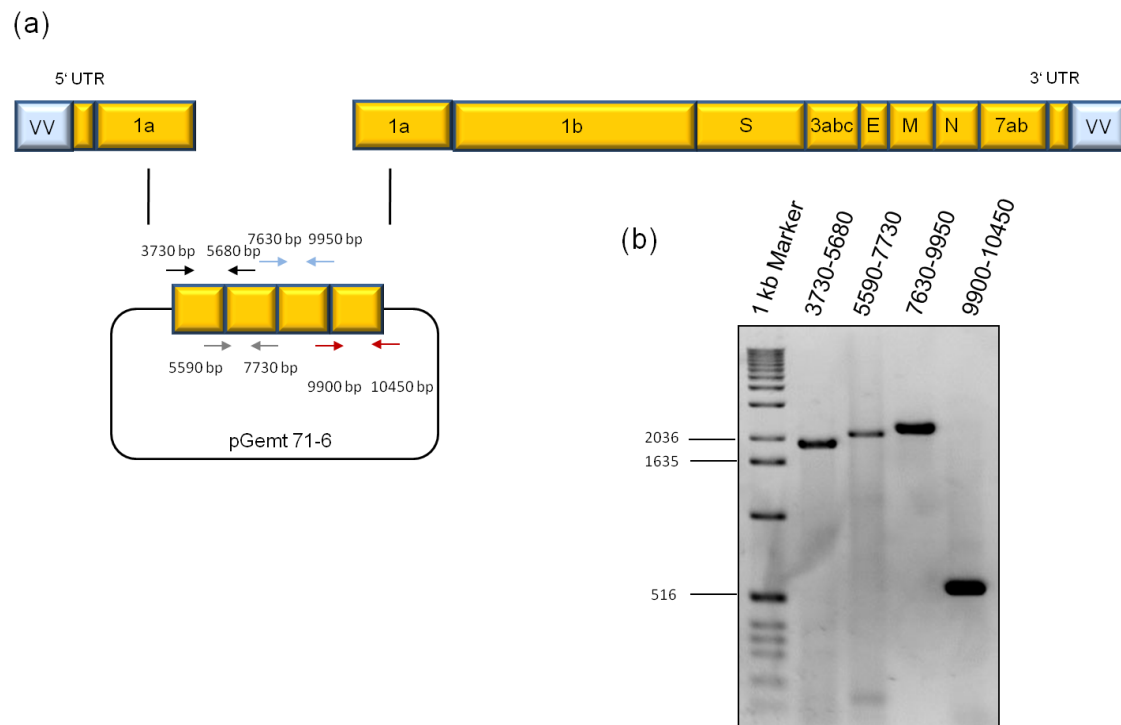
Zur Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die das Gen GPT sowie die flankierenden Serotyp II Sequenzen nt 1730-4230 und nt 9930-11700 an der gewünschten Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben, wurden bei fünf Vaccinia Virus Klonen (6-1-1-1, 6-1-1-2, 6-1-1-3, 6-1-3-1, 6-1-3-2) je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine NK und eine PK mitgeführt. PCR 1: Primerpaar 79-3730-F-SacII/ GPT-300as, PCR 2: Primerpaar GPT-250s/ 79-10450-R-NotI, PCR 3: Primerpaar 79-1730-F-XhoI/ 79-11700-R-NotI. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für die Negativselektion II eingesetzt wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

In Abbildung 4.11 ist zu sehen, dass die fünf getesteten rekombinanten Vaccinia Virus Klone das Gen GPT und die flankierenden Serotyp II Sequenzen an der gewünschten Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben.

Der rekombinante Vaccinia Virus Klon 6-1-3-2 wurde anschließend für die Infektion in der Negativselektion II eingesetzt.

#### 4.1.2.4 Negativselektion II

Im letzten Schritt wurde das Gen GPT durch die noch fehlenden Serotyp II FCoV Sequenzen nt 4230-9930 sowie durch die flankierenden Sequenzen nt 3730-4230 und nt 9930-10450 ersetzt (siehe Abb.4.12 (a)). Dabei diente der rekombinante Vaccinia Virus Klon 6-1-3-2 aus der Positivselektion II als Ausgangsvirus für die Infektion der CV-1-Zellen, die anschließend mit dem Plasmid pGemT 71-6 transfiziert wurden. Das Plasmid enthielt die Serotyp II Sequenz nt 3730-10450, die auf vier sich überlappenden RT-PCR-Produkten basierte (Primerpaare 79-3730-F-SacII/ 79-5680-R-Sall, 79-5590-F/ 79-7730-R-SacI, 79-7630-F/ 79-9930-R-Esp3I, 79-9930-F-Esp3I/ 79-10450-R-NotI) (siehe Abb. 4.12 (b)). Jedes RT-PCR-Produkt wurde zunächst in einen pGemT Vektor kloniert und die Sequenz überprüft. Über die Restriktionsstellen *Esp3I* und *SacI* erfolgte im ersten Schritt die Klonierung des Produktes 9900-10450 zu dem RT-PCR-Produkt 7630-9950 (pGemT 52-1). Im nächsten Schritt wurde über die Schnittstellen *BbvCI* und *SacII* das Produkt 5590-7730 in das Plasmid pGemT 52-1 kloniert (pGemT 66-7). Die Klonierung des letzten Fragments 3730-5680 erfolgte dann über die Schnittstellen *EcoNI* und *ApaI* in das Plasmid pGemT 66-7 (pGemT 71-6). An Position nt 9940 in der 79-1146 Sequenz ist eine *Clal*-Erkennungssequenz (ATCGAT) vorhanden, die durch Einführung einer stillen Mutation (TCG → TCC) in dem RT-PCR-Produkt 9900-10450 zerstört wurde. Das revers-genetische System für feline Coronaviren wurde so konstruiert, dass sich am 3'-Ende des FCoV-Inserts eine poly-(A)-Sequenz mit anschließender *Clal*-Schnittstelle befindet (Tekes, 2008b). Die rekombinante Vaccinia Virus DNA wird mit dem Restriktionsenzym *Clal* geschnitten, um eine *in vitro* transkribierte rekFCoV RNA mit definiertem 3'-Ende zu erhalten (siehe Kapitel 3.7.4). Um eine Restriktion der FCoV-Sequenz zu verhindern, war es wichtig, die *Clal*-Schnittstelle innerhalb der FCoV 79-1146 Sequenz zu zerstören. Diese Mutation diente zugleich als Markermutation für die spätere Unterscheidung des rekombinanten FCoV 79-1146 vom Ausgangsvirus FCoV 79-1146 (siehe Kapitel 4.1.4.1).

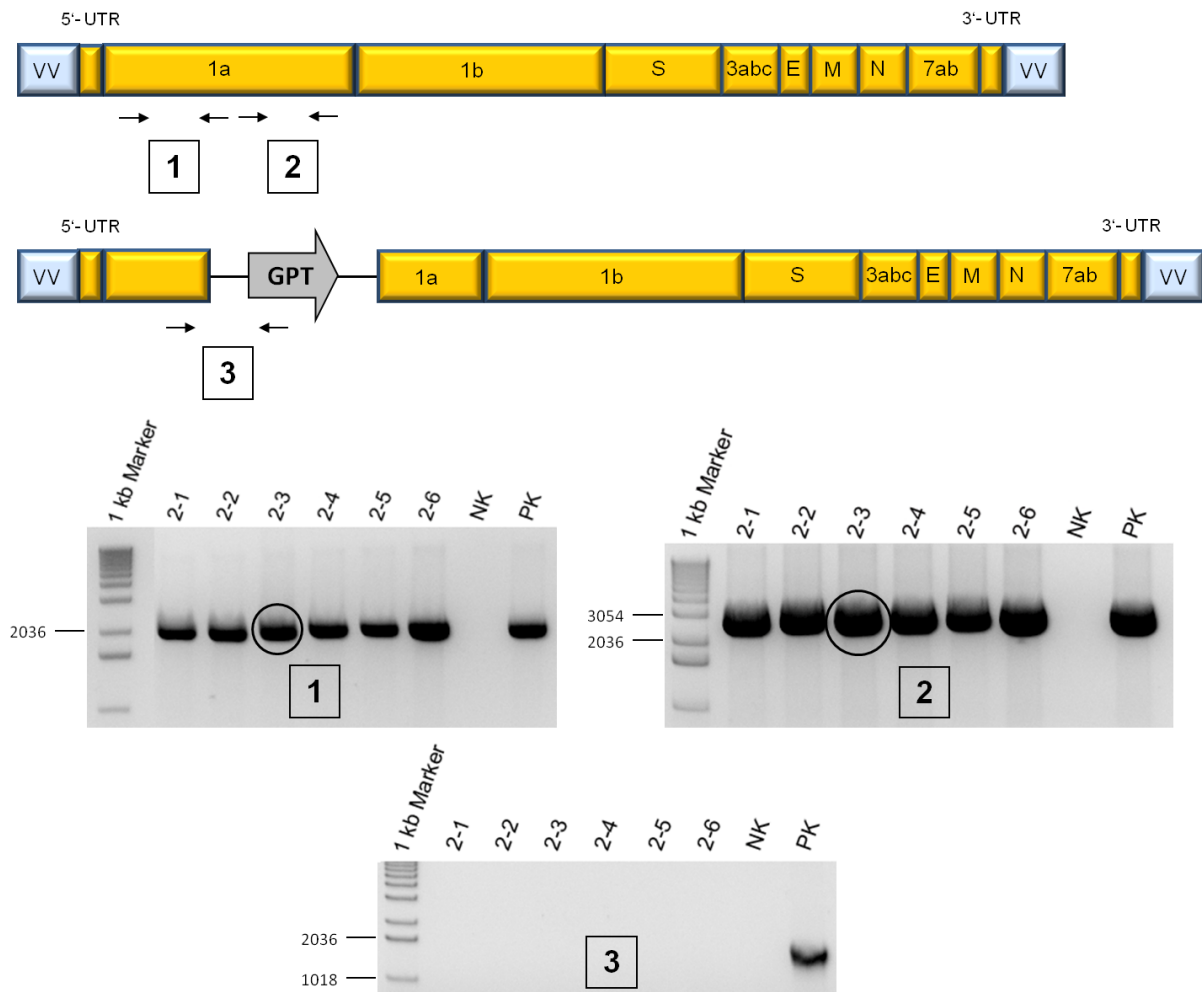


**Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Positivselektion II**

(a) Mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination in Verbindung mit Negativselektion wurden die Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Sequenzen nt 3730-10450 in das rekombinante Vaccinia Virus Genom vrekFCoV 79-1146 eingefügt. (b) Nachweis der RT-PCR-Produkte, die nacheinander in den Vektor pGemT kloniert wurden. Für die RT-PCR-Produkte wurde FCoV Stamm 79-1146 als Matrize verwendet.

Die Fähigkeit zur Rekombination von Vaccinia Viren wurde erneut benutzt, um das GPT-Gen durch die Serotyp II FCoV-Sequenz nt 3730-10450 zu ersetzen und somit die gesamte cDNA-Kopie des FCoV Stamm 79-1146 in das Vaccinia Virus Genom zu integrieren. Sechs rekombinante Vaccinia Virus Klone konnten im Anschluss an drei Runden Plaquereinigung auf D98OR-Zellen unter GPT-Negativselektion isoliert und mittels PCR überprüft werden (siehe Abb. 4.13).



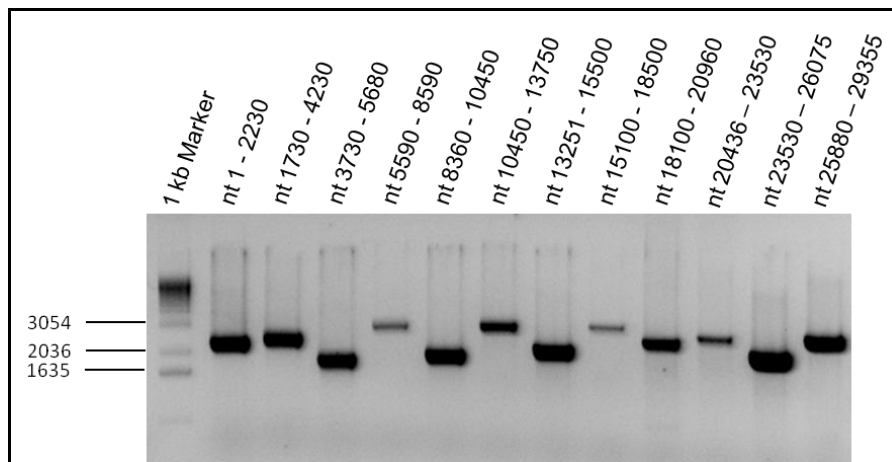


**Abb. 4.13: Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren aus der Negativselektion II mittels PCR**

Zur Identifizierung der rekombinanten Vaccinia Viren, die die fehlenden Serotyp II Sequenzen an der richtigen Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben, wurden bei sechs Vaccinia Virus Klonen (2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6) je drei Kontroll-PCRs durchgeführt. Zusätzlich wurden jeweils eine NK und eine PK mitgeführt. PCR 1: Primerpaar 79-3505-F/ 79-5680-R-Sall, PCR 2: Primerpaar 79-8590-F/ 79-11300-R, PCR 3: Primerpaar 79-3730-F-SacII/ GPT-300as. Der rekombinante Vaccinia Virus Klon, der anschließend für die Gewinnung eines rekombinanten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 verwendet wurde, ist mit einem schwarzen Kreis markiert.

Abbildung 4.13 zeigt, dass die sechs getesteten rekombinanten Vaccinia Virus Klone die Serotyp II Sequenzen an der gewünschten Position durch doppelte homologe Rekombination eingebaut haben. Um sicher zu gehen, dass die homologen Rekombinationen fehlerfrei abliefen und die zuvor eingefügten Sequenzen aus den einzelnen Selektionen (Positivselektion I, Negativselektion I, Positivselektion II) noch in dem Vaccinia Virus Genom vorliegen, wurde vrekFCoV 79-1146 DNA aus

infizierten CV-1-Zellen präpariert und das gesamte rekFCoV 79-1146 cDNA-Insert mit spezifischen Primern amplifiziert (siehe Abb 4.14) und sequenziert.



**Abb. 4.14: Nachweis des gesamten rekombinanten FCoV 79-1146 cDNA-Genoms durch PCR-Analyse**

12 sequenzüberlappende PCR-Produkte decken das gesamte rekFCoV 79-1146 c-DNA-Insert ab. Die Fragmentgrößen liegen zwischen 1,5 kb und 3 kb.

Die Herstellung eines rekombinanten Vaccinia Virus, das die genomlange cDNA des Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 beinhaltet, war erfolgreich. Vor Verwendung des rekombinanten Vaccinia Virus Klon 2-3 für die Gewinnung der rekombinanten Serotyp II FCoV RNA erfolgte die Sequenzierung des kompletten viralen Genoms. Als Grundlage dafür dienten die in Abbildung 4.14 gezeigten 12 PCR-Produkte. Abweichend von der veröffentlichten GenBank Sequenz (AY994055.1) befanden sich Punktmutationen an den Positionen nt 796 (G → T) und nt 17709 (G → A) des rekombinanten coronaviralen cDNA-Genoms. Während es sich bei nt 17709 um eine stille Mutation handelte, führte die Mutation an Position nt 796 zu einem Aminosäureaustausch (Trp → Cys). Beide Mutationen waren bereits in dem von mir verwendeten Ausgangsvirus FCoV Stamm 79-1146 vorhanden. Desweiteren beinhaltete die Sequenz eine stille Mutation (T → C) an Position nt 10729, die aus der Plasmidsequenz pGPT 148-6 stammt und nicht im FCoV Stamm 79-1146 vorkommt. In Tabelle 4.1 sind die nachgewiesenen Mutationen aufgelistet.

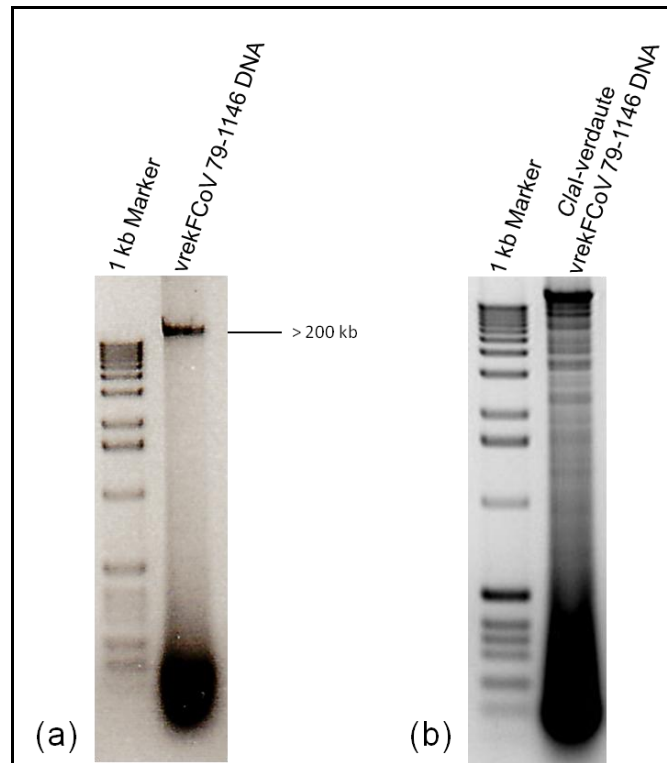
**Tab. 4.1: Mutationen im FCoV Genom vrekFCoV 79-1146**

In der Tabelle sind die einzelnen Nukleotidaustausche sowie ihre Positionen im viralen Genom vrekFCoV 79-1146 aufgeführt (rechts angegeben). Links sind die Mutationen angegeben, die bereits in dem von mir verwendeten Ausgangsmaterial FCoV Stamm 79-1146 vorhanden waren. Die stillen Mutationen an den Positionen nt 9943 (G → C) und nt 10729 (T → C) dienten als Markermutationen für die Unterscheidung des rekombinanten FCoV 79-1146 vom Ausgangsvirus FCoV 79-1146.

<b>FCoV Stamm 79-1146</b>	<b>vrekFCoV 79-1146</b>
G796T Trp→Cys	G796T Trp→Cys
	G9943C <i>Clal</i> -Schnittstelle
	T10729C
G17709A	G17709A

#### **4.1.3 Gewinnung des rekombinanten Serotyp II FCoV (rekFCoV 79-1146)**

Die Gewinnung (*rescue*) des rekombinanten Serotyp II FCoV 79-1146 setzte die Synthese von coronaviraler RNA voraus. Als Ausgangsmaterial diente die komplette FCoV 79-1146 cDNA, die in das Vaccinia Virus Genom integriert wurde (vrekFCoV 79-1146) (siehe Kapitel 4.1.2). Zunächst erfolgten die Präparation einer großen Menge an qualitativ hochwertiger vrekFCoV 79-1146 DNA aus infizierten BHK-21-Zellen (siehe Kapitel 3.1.4.4) (siehe Abb. 4.15 (a)) und ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *Clal* (siehe Abb. 4.15 (b)).

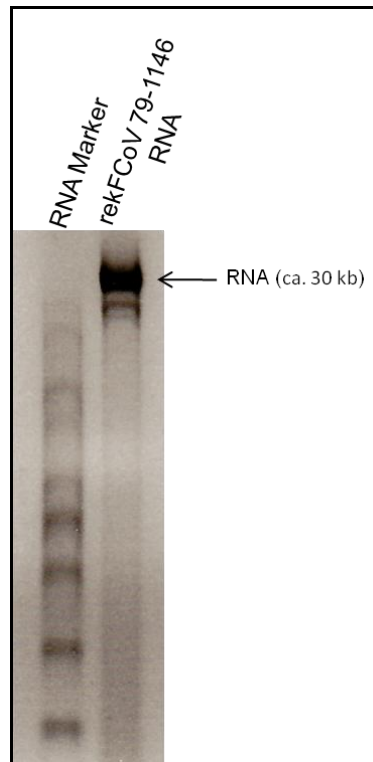


**Abb. 4.15: Nachweis der rekombinanten Vaccinia Virus DNA (vrekFCoV 79-1146) vor und nach Restriktionsverdau mit *ClaI***

(a) 1 µl der aus infizierten BHK-21-Zellen präparierten rekombinanten Vaccinia Virus DNA (vrekFCoV 79-1146) aufgetragen auf ein 1,5 %iges Agarosegel. (b) 1 µl der *ClaI*-verdauten rekombinanten Vaccinia Virus DNA.

Abbildung 4.15 (a) zeigt die präparierte und aufgereinigte rekombinante Vaccinia Virus DNA (vrekFCoV 79-1146). Aufgrund der Größe von vrekFCoV 79-1146 von > 200 kb ließ sich die Größe des DNA-Produkts mit dem eingesetzten 1 kb Marker nur sehr ungenau auf dem Agarosegel darstellen. In Abbildung 4.15 (b) ist das typische Muster der *ClaI*-verdauten Vaccinia Virus DNA zu sehen. Die Anzahl der Banden deutet auf zahlreiche *ClaI*-Erkennungssequenzen innerhalb des Vaccinia Virus Genoms hin. Aufgrund der Zerstörung der *ClaI*-Schnittstelle an Position nt 9930 im FCoV-Genom befindet sich die komplette FCoV-Sequenz oberhalb der Markerbanden. Bis auf einer *ClaI*-Schnittstelle im Anschluss an den Poly-(A)-Schwanz weist das FCoV-Genom 79-1146 keine weitere Erkennungssequenz für das Enzym auf. Die *ClaI*-verdauten rekombinante Vaccinia Virus DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation gereinigt

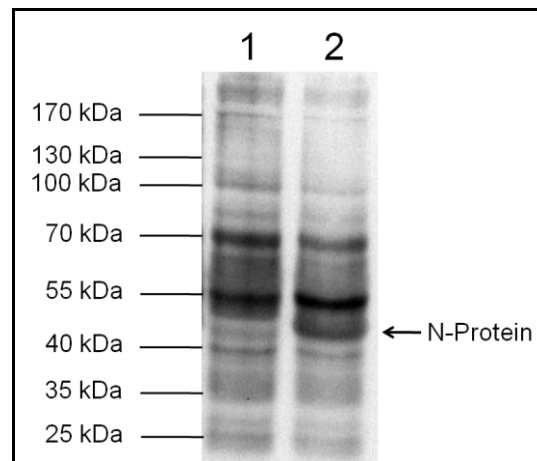
(siehe Kapitel 3.1.3.1) und für die *in vitro* Transkription verwendet (siehe Kapitel 3.4.4) (siehe Abb. 4.16).



**Abb. 4.16: *In vitro* transkribierte rekombinante FCoV RNA (rekFCoV 79-1146 RNA)**

1 µl der *in vitro* transkribierten rekFCoV 79-1146 RNA aufgetragen auf ein 1%iges formaldehydhaltiges Agarosegel. Die ca. 30 kb große coronavirusale RNA ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Die rekFCoV 79-1146 RNA wurde anschließend in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 3.6.6.2), in denen sie einen kompletten coronavirusalen Replikationszyklus durchlief, der zur Freisetzung infektiöser rekFCoV 79-1146 führte. BHK<sub>FCoV-N</sub> ist eine Tet-On-Zelllinie, die das coronavirusale Nukleoprotein N induzierbar exprimiert (siehe Abb. 4.17). Das N-Protein hat einen positiven Einfluss auf die coronavirusale Transkription und Replikation (Baric et al., 1988, Schelle et al., 2005).



**Abb. 4.17: Expression des coronavirusalen N-Proteins in der Tet-On-Zelllinie BHK<sub>FCoV-N</sub>**

Für die Expression des Nukleoproteins N wurden BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen zunächst mit Doxycyclin (2 mg/ml) induziert; nach 24 Stunden wurde das Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit 4 % Milchpulver blockiert. Zum Nachweis des coronavirusalen Nukleoproteins N wurde der Blot mit dem Immunsereum einer FCoV infizierten Katze und dem polyklonalen Sekundärantikörper Ziege anti-Katze IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert (1:10000) entwickelt. Links: Proteinmarker; Spur 1: nicht induzierte BHK<sub>FCoV-N</sub> Zellen; Spur 2: induzierte BHK<sub>FCoV-N</sub> Zellen; Pfeil: exprimierte N-Protein.

Aus Abbildung 4.17 geht hervor, dass nach Induktion mit Doxycyclin das coronavirusale Nukleoprotein N mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 46 kDa in den BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen exprimiert wird. BHK-Zellen besitzen allerdings keinen Rezeptor für feline Coronaviren. Somit können von den erfolgreich transfizierten BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen zwar infektiöse Viruspartikel produziert und freigesetzt werden, aber es findet keine Infektion von BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen statt. Daher erfolgte eine Kokultivierung mit einer Katzenzelllinie, FCWF-4-Zellen. Zwei Tage nach Transfektion wurden 5 ml des Überstandes auf frische FCWF-4-Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden war ein ZPE in Form einer Zelllyse nachweisbar. Der Überstand wurde als Stocklösung für weitere Experimente bei -70°C eingefroren. Aus den infizierten Zellen wurde Poly-(A)-RNA für RT-PCR-Analysen präpariert.

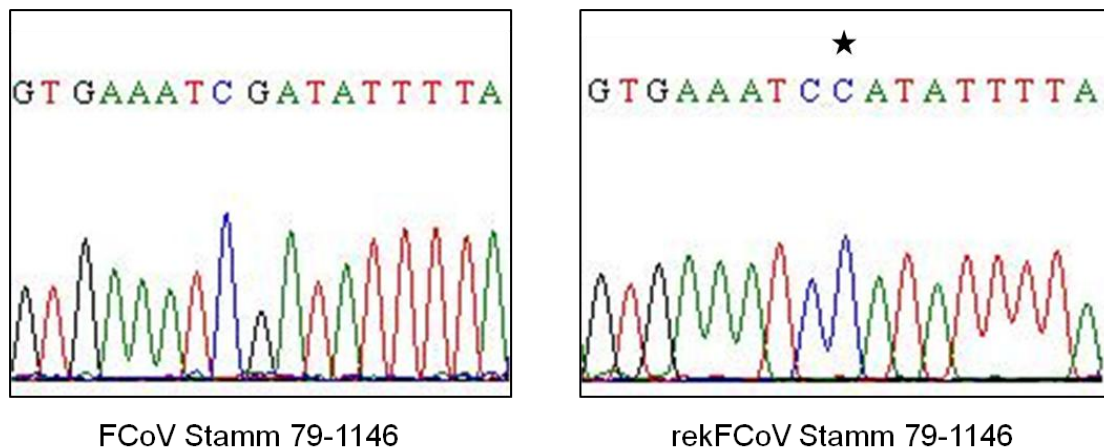
#### 4.1.4 Charakterisierung von rekFCoV 79-1146

Nach erfolgreicher Gewinnung des rekombinanten Serotyp II FCoV 79-1146 erfolgte zunächst der Nachweis von Markermutationen, um rekFCoV 79-1146 von dem

Ausgangsvirus FCoV 79-1146 unterscheiden zu können. Um zu überprüfen, inwieweit sich der Phänotyp des rekombinanten Virus 79-1146 von dem WT-Virus 79-1146 unterscheidet, wurden Untersuchungen in Bezug auf Wachstumsverhalten und Plaquemorphologie durchgeführt.

#### 4.1.4.1 Nachweis der Markermutationen

Mit Hilfe der Sequenzierung von RT-PCR-Produkten erfolgte der Nachweis von Markermutationen, die zur Unterscheidung von rekFCoV 79-1146 und FCoV 79-1146 dienen. Ein Beispiel ist in Abbildung 4.18 zu sehen.

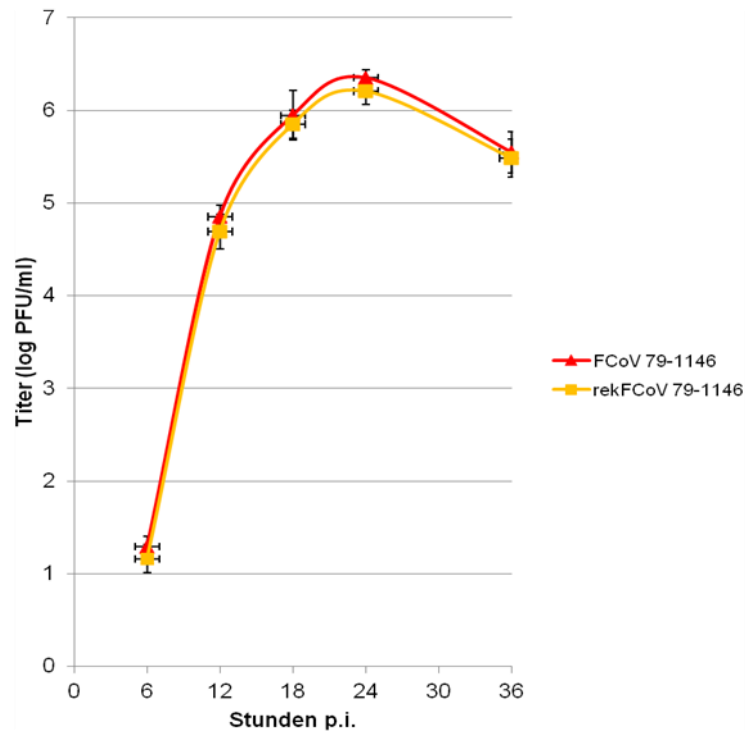


**Abb. 4.18: Nachweis der Markermutation in dem rekombinanten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146**

Sequenzanalyse des FCoV 79-1146 sowie des rekFCoV 79-1146 in einer Region, die bei dem rekombinanten Virus eine Markermutation (Stern) enthält. Der Nukleotidaustausch befindet sich an Position nt 9943 im FCoV-Genom.

#### 4.1.4.2 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten des rekombinanten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 im Vergleich zum Wildtyp zu analysieren, wurden von beiden Viren die Stocklösungen auf FCWF-4-Zellen austitriert. Anhand der erhaltenen Titer wurden FCWF-4-Zellen in einer 12-Loch Platte mit einer MOI von 0,001 infiziert und die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (6h, 12h, 18h, 24h, 36h) geerntet. Im Anschluss erfolgte erneut eine Titration der Überstände (Abb. 4.19).



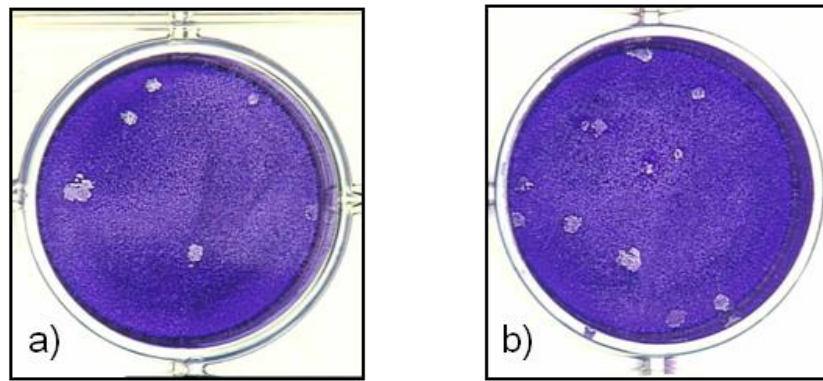
**Abb. 4.19: Wachstumskinetik von rekFCoV 79-1146 im Vergleich mit dem Wildtyp FCoV 79-1146**  
FCWF-4-Zellen wurden mit den Virussuspensionen infiziert (MOI 0,001) und der Überstand jeweils 6h, 12h, 18h, 24h und 36h p.i. geerntet und titriert.

In Abbildung 4.19 ist zu sehen, dass das Wachstumsverhalten von rekFCoV 79-1146 mit dem des Wildtyps nahezu identisch war. Beide Viren replizierten etwa gleich schnell und erreichten 24 h p.i. den höchsten Titer von durchschnittlich  $2 \times 10^6$  PFU/ml. Auch zu den anderen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 18 h und 36 h) waren die Titerunterschiede nicht signifikant.

#### 4.1.4.3 Plaquemorphologie

Für die weitere Charakterisierung erfolgte die Untersuchung der Plaquemorphologie von rekFCoV 79-1146 im Vergleich zum Wildtyp FCoV 79-1146. FCWF-4-Zellen wurden mit einer geeigneten Verdünnung der Stocklösung des jeweiligen Virus infiziert, mit Carboxy-methylcellulose-Medium überschichtet und für 24 h inkubiert. Anschließend fand eine Färbung der fixierten Zellen mit Kristallviolett statt (Abb. 4.20).





**Abb. 4.20: Plaquemorphologie von (a) rekFCoV 79-1146 im Vergleich zum (b) Wildtyp FCoV 79-1146**

FCWF-4-Zellen wurden mit den Virus-Stocklösungen infiziert, für 24 h inkubiert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt.

Sowohl rekFCoV 79-1146 als auch FCoV 79-1146 zeigten bereits 24 h p.i. eine deutliche Plaquebildung. Die durchschnittliche Plaquegröße von rekFCoV 79-1146 lag bei  $0,768 \pm 0,16$  mm und die von FCoV 79-1146 bei  $0,799 \text{ nm} \pm 0,15$  mm ( $p = 0,449$ ). Somit unterschieden sich die beiden Viren hinsichtlich der Plaquegröße nicht signifikant voneinander.

#### 4.1.5 Infektion von Katzen

Um die Virulenz des rekombinanten FCoV 79-1146 zu bestimmen, wurde ein Infektionsversuch mit Katzen durchgeführt (Tekes und Spies et al., 2012). Für den Versuch wurden je zwei SPF-Katzen im Alter von 4-5 Monaten intraperitoneal (i.p.) mit  $10^6$  PFU des rekombinanten FCoV 79-1146 oder des Wildtyps FCoV 79-1146 infiziert. Als Kontrolle diente PBS. Die Katzen wurden täglich auf klinische Anzeichen einer FIP überprüft. Über einen Zeitraum von acht Wochen wurden wöchentlich Blutproben genommen und Kotproben gesammelt. Nach der Infektion bekamen die Katzen leichtes Fieber, das nach 3-4 Tagen verschwand. 2-3 Wochen p.i. zeigten sich erste Anzeichen einer klinischen Erkrankung. Die Tiere zeigten Anorexie, Appetits- und Gewichtsverlust, Bindehautentzündung und Anämie. Die Symptome wurden von wiederkehrendem Fieber begleitet, was typisch für FIP ist. Die Antikörpertiter gegen FCoV erreichten drei Wochen p.i. Werte von 1:20480 und blieben für die restliche Zeit des Experiments auf dieser Höhe. Die Antikörpertiter

wurden mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenz-Assays unter Verwendung eines polyklonalen Katzenserums im diagnostischen Labor des Instituts bestimmt. In beiden Gruppen wurde bei einer der beiden Katzen sieben Wochen p.i. eine klinische Manifestation der FIP festgestellt und die betreffenden Katzen daher eingeschläfert. Bei der pathologischen Untersuchung konnten charakteristische Symptome der FIP detektiert werden: Neben einem Ascites waren die Leber, die Milz, die Niere sowie die Serosa der Bauchhöhle mit Granulomen bedeckt. Das Experiment zeigte, dass es sich bei dem rekombinanten FCoV Serotyp II 79-1146 sowie bei dem Wildtyp FCoV 79-1146 um virulente Stämme handelt, die FIP induzieren können.

Nach Beendigung des Tierversuchs isolierte Frau Dr. Bank-Wolf die virale RNA aus dem Ascites und aus den Granulomen von der Katze, die mit rekFCoV 79-1146 infiziert worden war. Mit Hilfe der Real Time RT-PCR konnte ermittelt werden, dass die Niere und die Milz die höchste Menge an viraler RNA aufwiesen (Daten nicht gezeigt); diese RNA wurde für die Herstellung von überlappenden FCoV-spezifischen PCR-Produkten (ca. 1,5 kb) verwendet; die Sequenz des gesamten Genoms konnte bestimmt werden. Bei einem Vergleich von der ermittelten rekFCoV 79-1146 Sequenz mit der rekFCoV 79-1146 Input-Sequenz konnten zwei Nukleotidaustausche in dem viralen Genom detektiert werden, das aus der Milz isoliert wurde. In dem aus der Niere stammenden viralen Genom konnten sieben Nukleotidaustausche sowie drei stille Mutationen festgestellt werden (siehe Tab. 4.2). Eine Mutation in dem Genom aus der Milz befand sich im S-Gen an Position nt 22468 (T→C), wodurch es zu einem Austausch der Aminosäure Leucin gegen Prolin kam. Die zweite Mutation fand im akzessorischen Gen 3c an Position nt 25353 (T→C) statt. Dieser Austausch war besonders interessant. Das Input-Virus rekFCoV 79-1146 enthielt an dieser Position im akzessorischen 3c-Gen ein Stop-Codon. Aufgrund des Nukleotidaustausches wurde nun die Aminosäure Glutamin kodiert und somit das 3c-Gen wiederhergestellt. Der Nukleotidaustausch im S-Gen an Position nt 22468 sowie der Austausch im Gen 3c an Position nt 25353 wurden auch in der viralen Sequenz aus der Niere gefunden. Zudem sind in der Niere zwei Mutationen im Gen 1a an den Positionen nt 7544 (A→C) und nt 13089 (G→C) detektiert worden, was die Aminosäureaustausche Serin gegen Arginin bzw. Methionin gegen Isoleucin zur Folge hatte. Neben dem Nukleotidaustausch an Position nt 22468 sind zwei weitere Mutationen im S-Gen an den Positionen nt 22365 (G→C) und nt 24155 (T→G) aufgetreten und eine Mutation im N-Gen an Position nt 27819 (G→T). Diese

Mutationen resultieren in folgenden Aminosäureaustauschen: Valin gegen Leucin, Cystein gegen Tryptophan bzw. Cystein gegen Phenylalanin. Desweiteren traten drei stille Mutationen im 1a Gen auf.

Zudem konnte eine genomlange Sequenz mittels RT-PCR bestimmt werden, die auf der isolierten RNA aus dem Ascites der an FIP erkrankten Katze basiert, die mit dem Wildtyp FCoV 79-1146 infiziert wurde. Der Vergleich dieser FCoV 79-1146 Sequenz mit der FCoV 79-1146 Input-Virus-Sequenz ergab neun Nukleotidunterschiede. Drei Mutationen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten, traten im S-Gen (A207742G, Lysin gegen Glutaminsäure; G21366T, Valin gegen Leucin; G23280T, Asparaginsäure gegen Thyrosin) auf, eine in nsp3 des Replikasegens (A4682G, Isoleucin gegen Valin), eine im 3c-Gen (T25353C, Stop gegen Glutamin) und eine im E-Gen (T26165C, Threonin gegen Isoleucin). Besonders bemerkenswert war, dass die Wiederherstellung des ORF, der für das akzessorische Protein 3c kodiert, auch in der viralen RNA zu finden war, die von der mit dem Wildtyp FCoV 79-1146 infizierten Katze stammt. Eine Übersicht über die Nukleotid- und Aminosäureaustausche ist in Tabelle 4.2 zu finden.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Nukleotid- und Aminosäureaustausche verglichen mit der publizierten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Sequenz (AY994055.1) (Tekes und Spies et al., 2012).

FCoV 79-1146 (Zellkultur)	rekFCoV 79-1146 (Zellkultur)	Ascites (von infizierter Katze mit 79-1146)	Milz (von infizierter Katze mit rekFCoV 79-1146)	Niere (von infizierter Katze mit rekFCoV 79-1146)	Protein
-	-	T616C	-	-	1a-nsp1
G796T Trp→Cys	G796T Trp→Cys	G796T Trp→Cys	G796T Trp→Cys	G796T Trp→Cys	1a-nsp2
-	-	A4682G Ile→Val	-	-	1a-nsp3
-	-	-	-	A7544C Ser→Arg	1a-nsp3
-	-	-	-	C7933T	1a-nsp4
-	-	-	-	T7996C	1a-nsp4
-	G9943C Clal	-	G9943C	G9943C	1a-nsp6
-	T10729C	-	T10729C	T10729C	1a-nsp6
-	-	-	-	G13089C Met→Ile	1a-nsp6
G17709A	G17709A	G17709A	G17709A	G17709A	1ab-nsp14
-	-	G20567T	-	-	S
-	-	T20657C	-	-	S
-	-	A20742G Lys→Glu	-	-	S
-	-	G21366T Val→Leu	-	-	S
-	-	-	-	G22365C Val→Leu	S
-	-	-	T22468C Leu→Pro	T22468C Leu→Pro	S
-	-	G23280T Asp→Tyr	-	-	S
-	-	-	-	T24155G Cys→Trp	S
-	-	T25353C Stop→Gln	T25353C Stop→Gln	T25353C Stop→Gln	3c
-	-	-	-	T25562C	3c
-	-	T26165C Thr→Ile	-	-	E
-	-	-	-	G27819T Cys→Phe	N

Um die Auswirkungen der Mutationen im 3c-Gen an Position nt 25353 und im S-Gen an Position nt 22468 einzeln sowie in Kombination analysieren zu können, wurden mit Hilfe des revers-genetischen Systems drei rekombinante FCoV hergestellt. (1) ein rekombinantes FCoV 79-1146 mit einem intakten 3c-Gen; (2) ein rekombinantes FCoV 79-1146, das im S-Gen an Position nt 22468 einen Nukleotidaustausch aufweist, das den Aminosäureaustausch Leucin gegen Prolin zur Folge hat; (3) ein rekombinantes FCoV 79-1146, das ähnlich zu den isolierten Genomen aus der Milz und der Niere über beide Mutationen in Kombination verfügt. In Abbildung 4.21 sind die nachgebauten rekombinanten Viren mit den eingeführten Nukleotidveränderungen schematisch aufgeführt.



**Abb. 4.21: Rekombinante feline Coronaviren mit eingeführten Nukleotidveränderungen**

a) rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, mit dem eingeführten Nukleotidaustausch im 3c-Gen an Position nt 25353 (T→C), b) rekFCoV 79-1146  $\Delta S$ , mit dem eingeführten Nukleotidaustausch im S-Gen an Position nt 22468 (T→C), c) rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$ , mit den eingeführten Nukleotidveränderungen in den Genen S und 3c; schwarze Kreise: eingeführte Nukleotisaustausche.

#### 4.1.6 Herstellung von vrekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop, vrekFCoV 79-1146 $\Delta S$ und vrekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop; $\Delta S$

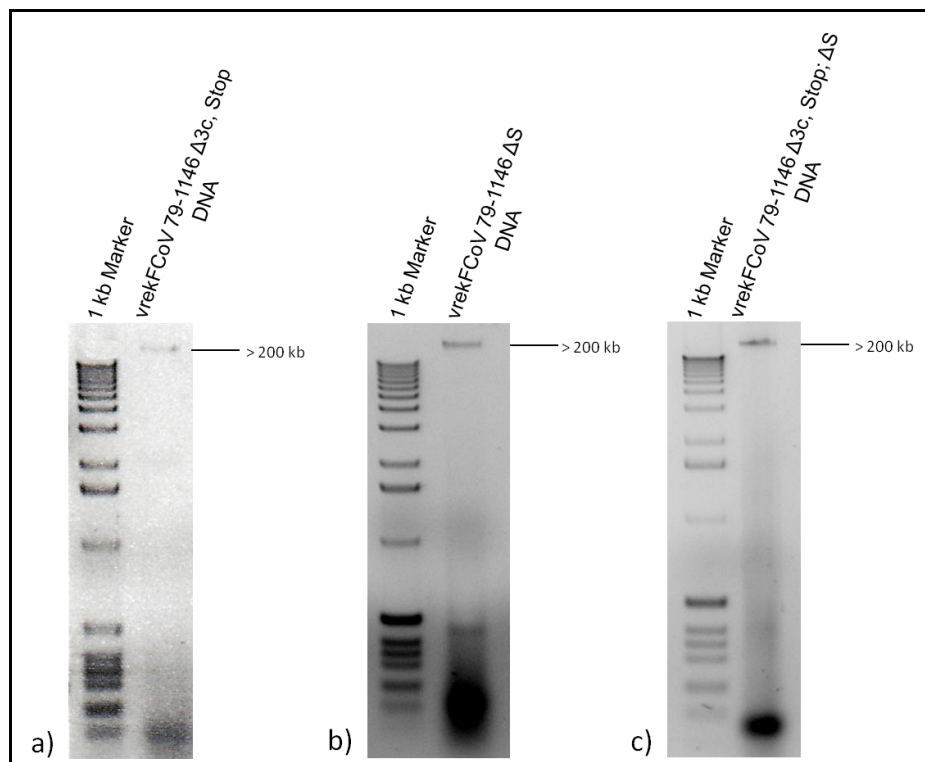
Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von vrekFCoV  $\Delta 3c$ , Stop und vrekFCoV  $\Delta S$  diente das in Kapitel 4.1.2 hergestellte vrekFCoV 79-1146. Durch Vaccinia Virus vermittelter homologer Rekombination in Verbindung mit Positiv- und Negativselektion wurden die gewünschten Nukleotidveränderungen eingeführt.

Nach Infektion von CV-1-Zellen mit vrekFCoV 79-1146 erfolgte eine Transfektion mit dem Plasmid pGPT 245-3 bzw. pGPT 374-1 (siehe Kapitel 3.7.4, Tab. 3.4). Die rekombinanten Vaccinia Viren, die nach erfolgter homologer Rekombination und drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Positivselektion das GPT-Gen anstelle des 3c- bzw. S-Gens eingebaut hatten, wurden ermittelt und als Ausgangsmaterial für den Austausch des GPT-Gens durch die Sequenz mit der gewünschten Mutation eingesetzt. Dafür wurden CV-1-Zellen jeweils mit dem rekombinanten Vaccinia Virus aus der Positivselektion infiziert und mit dem Plasmid pGemT 235-10 bzw. pGemT 370-2 (siehe Kapitel 3.7.4, Tab. 3.4) transfiziert. Nach einer erneuten doppelten homologen Rekombination sowie drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Negativselektion wurden rekombinante Vaccinia Viren isoliert, die ein intaktes 3c-Gen (vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop) bzw. einen Nukleotidaustausch (T $\rightarrow$ C) an Position nt 22468 im S-Gen (vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ S) aufwiesen. Um die homologen Rekombinationen und die eingeführten Mutationen zu überprüfen, wurde die DNA von vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop bzw. vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ S aus infizierten Zellen präpariert und die betroffenen Rekombinationsstellen mittels PCR amplifiziert und sequenziert.

Anschließend erfolgte die Herstellung von vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S, das beide Mutationen in Kombination aufweist. Als Ausgangsvirus wurde das rekombinante Vaccinia Virus vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop eingesetzt, da es bereits über die eingefügte Mutation an Position nt 25353 im 3c-Gen verfügte. Die Transfektion von vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop infizierten CV-1-Zellen wurde mit dem Plasmid pGPT 374-1 durchgeführt. Das rekombinante Vaccinia Virus, das aufgrund homologer Rekombination und anschließender GPT-Positivselektion das GPT-Gen anstelle des S-Gens eingebaut hatte, diente als Ausgangsmaterial für den Austausch durch die S-Gen-Sequenz mit gewünschter Mutation. Die Transfektion der infizierten CV-1-Zellen erfolgte mit dem Plasmid pGemT 370-2. Nach erfolgreicher GPT-Negativselektion wurde ein rekombinantes Vaccinia Virus (vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S) isoliert, das sowohl ein intaktes 3c-Gen als auch einen eingefügten Nukleotidaustausch im S-Gen an Position nt 22468 aufwies. Genau wie bei vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop und vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ S erfolgte auch bei vrekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S eine Sequenzüberprüfung der Rekombinationsstellen.

#### 4.1.7 Gewinnung von rekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop, rekFCoV 79-1146 $\Delta S$ und rekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop; $\Delta S$

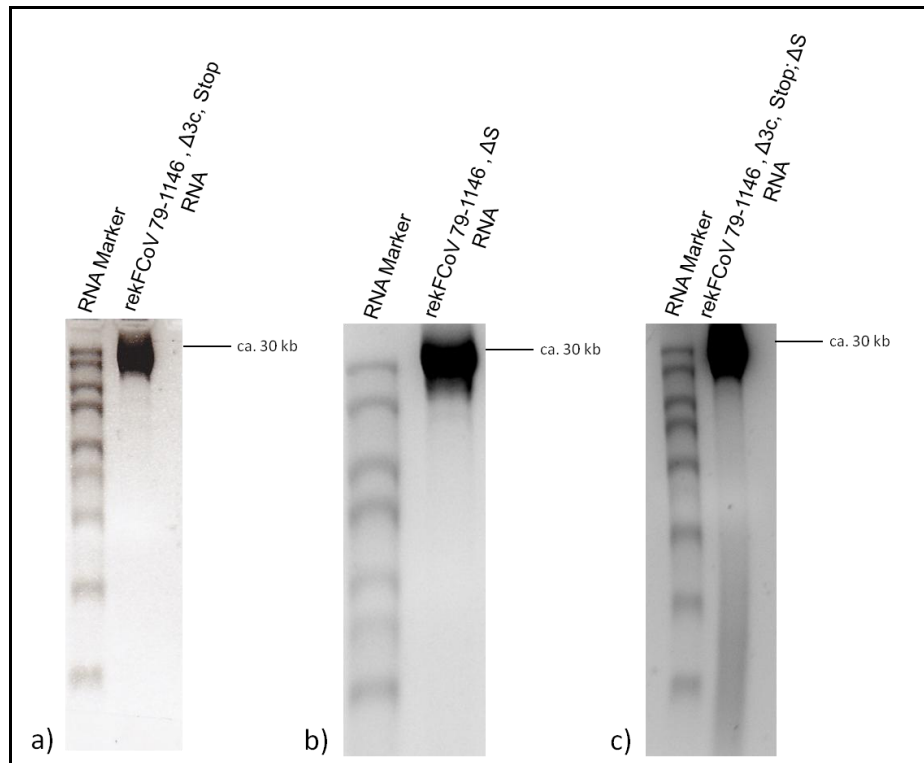
Für die Gewinnung der rekombinanten FCoVs rekFCoV  $\Delta 3c$ , Stop, rekFCoV  $\Delta S$  und rekFCoV  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$  wurde, wie in Kapitel 3.1.4.4 beschrieben, eine große Menge an qualitativ hochwertiger DNA von vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, vrekFCoV 79-1146  $\Delta S$  bzw. vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$  aus infizierten BHK-21-Zellen präpariert (siehe Abb. 4.22). Anschließend erfolgte der Verdau der rekombinanten Vaccinia Virus DNA mit dem Restriktionsenzym *Clal*.



**Abb. 4.22: Nachweis der rekombinanten Vaccinia Virus DNA von a) vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, b) vrekFCoV 79-1146  $\Delta S$  und c) vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$**

Die rekombinante Vaccinia Virus DNA besitzt eine Größe von > 200 kb.

Die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigte *Clal*-verdaute rekombinante Vaccinia Virus DNA von vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, vrekFCoV 79-1146  $\Delta S$  bzw. vrekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$  wurde anschließend *in vitro* transkribiert (siehe Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: In *vitro* transkribierte rekombinante FCoV RNA von rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop; rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S und rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S**

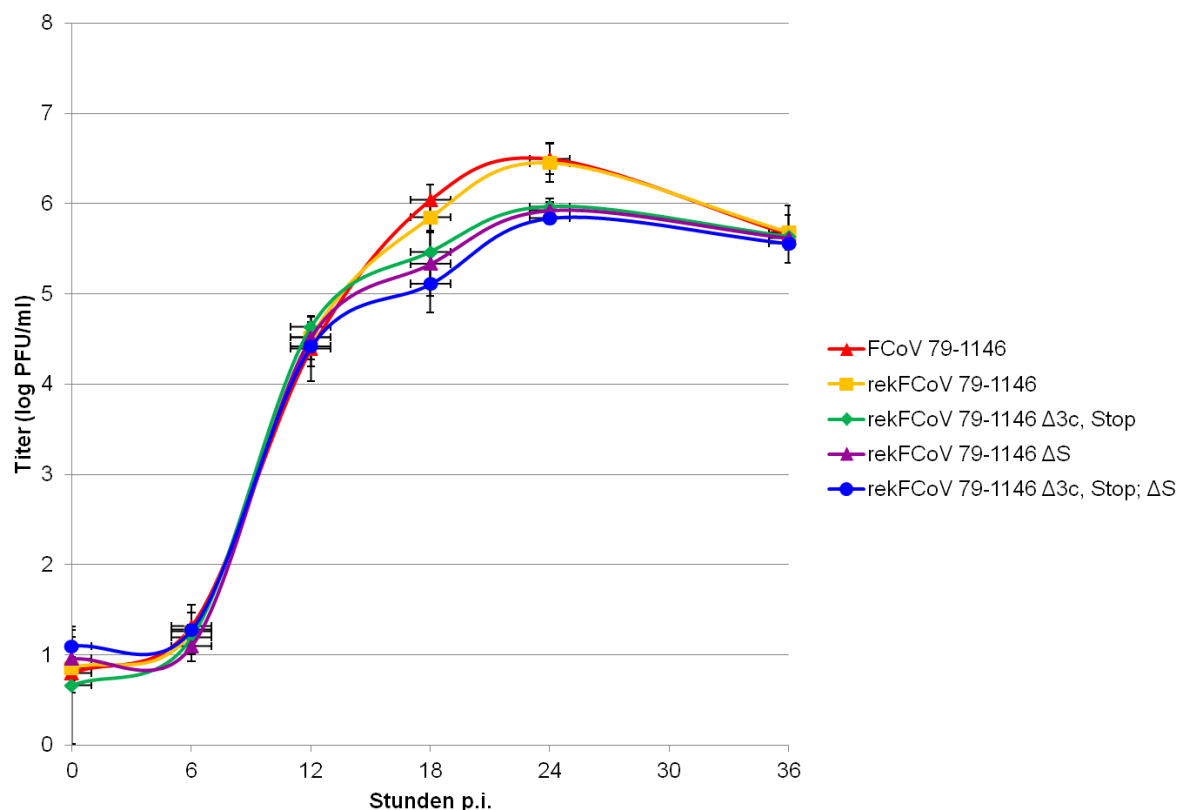
Die *in vitro* transkribierte coronavirale RNA ist ca. 30 kb groß.

Nach *in vitro* Transkription erfolgte die Elektroporation der rekFCoV RNA von rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop, rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S bzw. rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen. Zwei Tage nach Transfektion wurden 5 ml des Überstandes auf frische FCWF-4-Zellen gegeben. Während die rekombinanten FCoVs rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop und rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S bereits nach 24 Stunden einen ZPE zeigten, war dieser bei rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S erst nach 48 Stunden sichtbar. Der Überstand wurde als Stocklösung für weitere Experimente bei -70°C eingefroren. Aus den infizierten Zellen wurde Poly-(A)-RNA für RT-PCR-Analysen präpariert und die eingefügten Nukleotidveränderungen mittels Sequenzierung nachgewiesen.



#### 4.1.8 Wachstumsverhalten von rekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop, rekFCoV 79-1146 $\Delta S$ und rekFCoV 79-1146 $\Delta 3c$ , Stop; $\Delta S$

Um zu analysieren, ob die einzelnen Mutationen sowie die Kombination der beiden Mutationen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der rekombinanten FCoV's rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, rekFCoV 79-1146  $\Delta S$  bzw. rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$  im Vergleich zum rekFCoV 79-1146 und zum Wildtyp FCoV 79-1146 haben, erfolgte eine Infektion von FCWF-4-Zellen mit den fünf Viren jeweils mit einer MOI von 0,001. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (6h, 12h, 18h, 24h, 36h) geerntet und austitriert (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24: Wachstumskinetik von rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop, rekFCoV 79-1146  $\Delta S$  und rekFCoV 79-1146  $\Delta 3c$ , Stop;  $\Delta S$  im Vergleich mit rekFCoV 79-1146 und FCoV 79-1146**

FCWF-4-Zellen wurden mit den Virussuspensionen infiziert (MOI 0,001) und der Überstand jeweils 6h, 12h, 18h, 24h und 36h p.i. geerntet und titriert.

Aus Abbildung 4.24 geht hervor, dass der Verlauf der Wachstumskinetik bei den fünf Viren ähnlich war. Der Titer der Viren stieg 12 h p.i. stark an und erreichte 24 h p.i. seinen höchsten Stand. Wie in Kapitel 4.1.4.2 beschrieben, war das

Wachstumsverhalten von rekFCoV 79-1146 mit dem des Wildtyps FCoV 79-1146 nahezu identisch; die erreichten Titer unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Die Titer der rekombinanten Viren rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop, rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S und rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S zeigten untereinander zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Abweichung. Verglichen mit den Titern von rekFCoV 79-1146 und von FCoV 79-1146 wurde ein Unterschied 18 h p.i. festgestellt. Während der Titer 18 h p.i. von rekFCoV 79-1146  $\Delta$  3c, Stop ( $\bar{x}$   $3,7 \times 10^5$  PFU/ml) nicht signifikant von dem Titer des Wildtyps ( $\bar{x}$   $1,7 \times 10^6$  PFU/ml) ( $p = 0,084$ ) bzw. von dem Titer des rekFCoV 79-1146 ( $\bar{x}$   $7,3 \times 10^5$  PFU/ml) ( $p = 0,2$ ) abwich, unterschied sich der Titer von rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S ( $\bar{x}$   $2,2 \times 10^5$  PFU/ml) signifikant vom Titer des Wildtyp ( $p = 0,034$ ). Die Doppelmutante rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S wies einen durchschnittlichen Titer von  $1,6 \times 10^5$  PFU/ml auf und wich somit signifikant von rekFCoV 79-1146 ( $p = 0,022$ ) und vom Wildtyp ( $p = 0,011$ ) ab. 24 h p.i. unterschieden sich die Titer von rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop ( $\bar{x}$   $9,3 \times 10^5$  PFU/ml), rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S ( $\bar{x}$   $8,7 \times 10^5$  PFU/ml) und rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S ( $\bar{x}$   $7 \times 10^5$  PFU/ml) allesamt signifikant von rekFCoV 79-1146 ( $\bar{x}$   $3,1 \times 10^6$  PFU/ml) ( $p = 0,019$ ;  $p = 0,021$  bzw.  $p = 0,009$ ) und vom Wildtyp ( $\bar{x}$   $3,3 \times 10^6$  PFU/ml) ( $p = 0,007$ ;  $p = 0,010$  bzw.  $p = 0,004$ ). Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die eingefügten Nukleotidveränderungen, alleine und in Kombination, verglichen mit rekFCoV 79-1146 und FCoV 79-1146 einen Einfluss auf den Titer der Viren in Zellkultur haben. Um die Virulenz von rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop, rekFCoV 79-1146  $\Delta$ S und rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop;  $\Delta$ S zu bestimmen, sind in Zukunft Infektionsversuche mit Katzen durchzuführen.

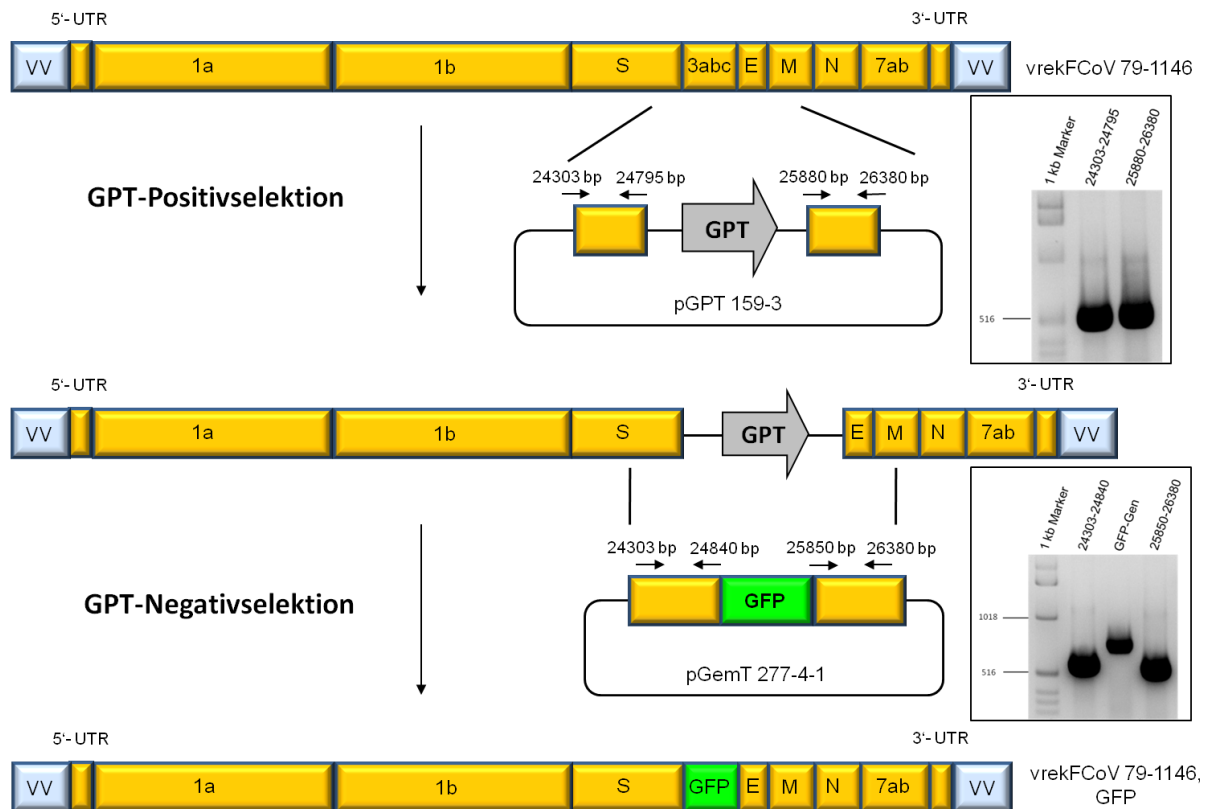
#### 4.2 Feline Coronaviren als Vektor

Neben der Herstellung von kompletten rekombinanten Virusgenomen spielen revers-genetische Systeme auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Vektoren für die Expression von Reportergenen, die Herstellung von Impfstoffen und die Therapie. Coronaviren bieten mehrere Vorteile als Vektoren: (1) diese Viren besitzen das größte RNA-Virus-Genom und haben Platz für die Insertion von großen Fremdgenen (Enjuanes et al., 2000). (2) Coronaviren sind einzelsträngige RNA-Viren, die im Cytoplasma ohne eine DNA-Zwischenstufe replizieren; die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom ist unwahrscheinlich (Lai und Cavanagh,

1997; Enjuanes et al., 2001). (3) Der Tropismus von Coronaviren kann durch die Veränderung des S-Gens verändert werden (Kuo et al., 2000; Sanchez et al., 1999; de Haan et al., 2005). (4) Durch Deletion der gruppenspezifischen, akzessorischen Gene können virulente Coronaviren in attenuierte Viren überführt werden (Haijema et al., 2004; Brian und Baric, 2005; Lai et al., 2007). (5) Infektiöse coronavirale cDNA ist verfügbar für die Konstruktion von Expressionssystemen.

#### **4.2.1 FCoV als Vektor für das Reportergen GFP**

Um die coronaviralen Treffzellen identifizieren und die Replikation in diesen Zellen mit hoher Empfindlichkeit untersuchen zu können, eignen sich besonders coronavirale Vektoren, die Reportergene exprimieren. Das Serotyp I FCoV Stamm Black hat sich bereits als Vektor für die Expression von Reportergenen bewährt (Tekes et al., 2008a). Es war daher naheliegend, auch ein Reportergen-exprimierendes Serotyp II FCoV zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das rekombinante Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 als Vektor für die Expression des grün fluoreszierenden Reportergens GFP verwendet. Mittels Vaccinia Virus vermittelter homologer Rekombination wurden die Gene 3abc von vrekFCoV 79-1146 durch das Reportergen GFP ersetzt (siehe Abb. 4.25).

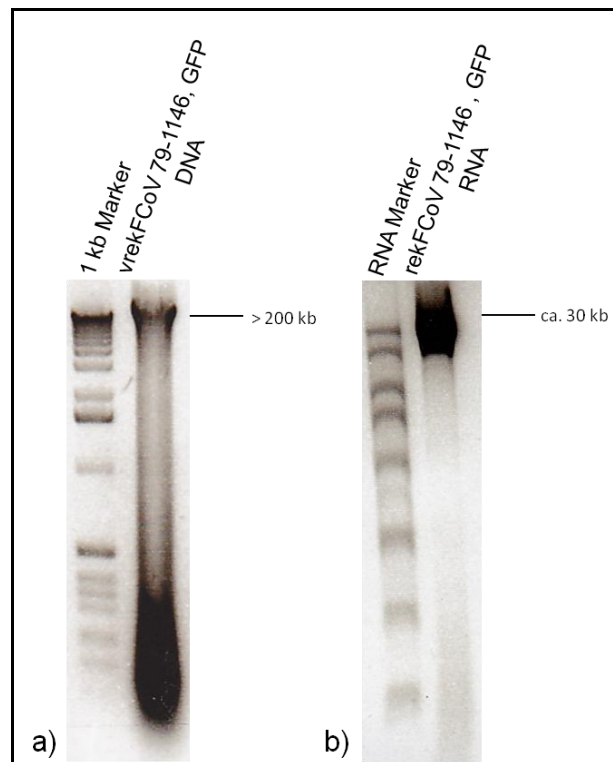


**Abb. 4.25: Herstellung von vrekFCoV 79-1146, GFP**

Die akzessorischen Gene 3abc von vrekFCoV 79-1146 wurden mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination in Verbindung mit GPT-Positiv- und Negativselektion durch das grün fluoreszierende Reportergen GFP (grüne Box) ersetzt.

Nach Infektion von CV-1-Zellen mit vrekFCoV 79-1146 erfolgte eine Transfektion mit dem Plasmid pGPT 159-3 (siehe Kapitel 3.7.4, Tab. 3.4). Unter Nutzung der Rekombination wurde das GPT-Gen und flankierende FCoV-Sequenzen anstelle der Gene 3abc in die coronavirale cDNA integriert. Im Anschluss an drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Positivselektion wurde ein rekombinantes Vaccinia Virus selektiert, das anstelle der Gene 3abc das GPT-Gen aufwies. Dieses Virus diente anschließend als Ausgangsmaterial für den Austausch des GPT-Gens durch das GFP-Gen. Die Transfektion der infizierten CV-1-Zellen erfolgte mit dem Plasmid pGemT 277-4-1 (siehe Kapitel 3.7.4, Tab. 3.4). Nach einer erneuten doppelten homologen Rekombination wurde das GPT-Gen durch das Reportergen GFP ersetzt. Die Isolierung des rekombinanten Vaccinia Virus vrekFCoV 79-1146, GFP erfolgte durch Negativselektion. Um rekFCoV 79-1146, GFP zu gewinnen, wurde wie in Kapitel 3.1.4.4 beschrieben, DNA aus vrekFCoV 79-1146, GFP infizierten BHK-21-

Zellen in präparativem Maßstab hergestellt (siehe Abb. 4.26 (a)), mit dem Restriktionsenzym *Clal* verdaut und *in vitro* transkribiert (siehe Abb. 4.26 (b)).

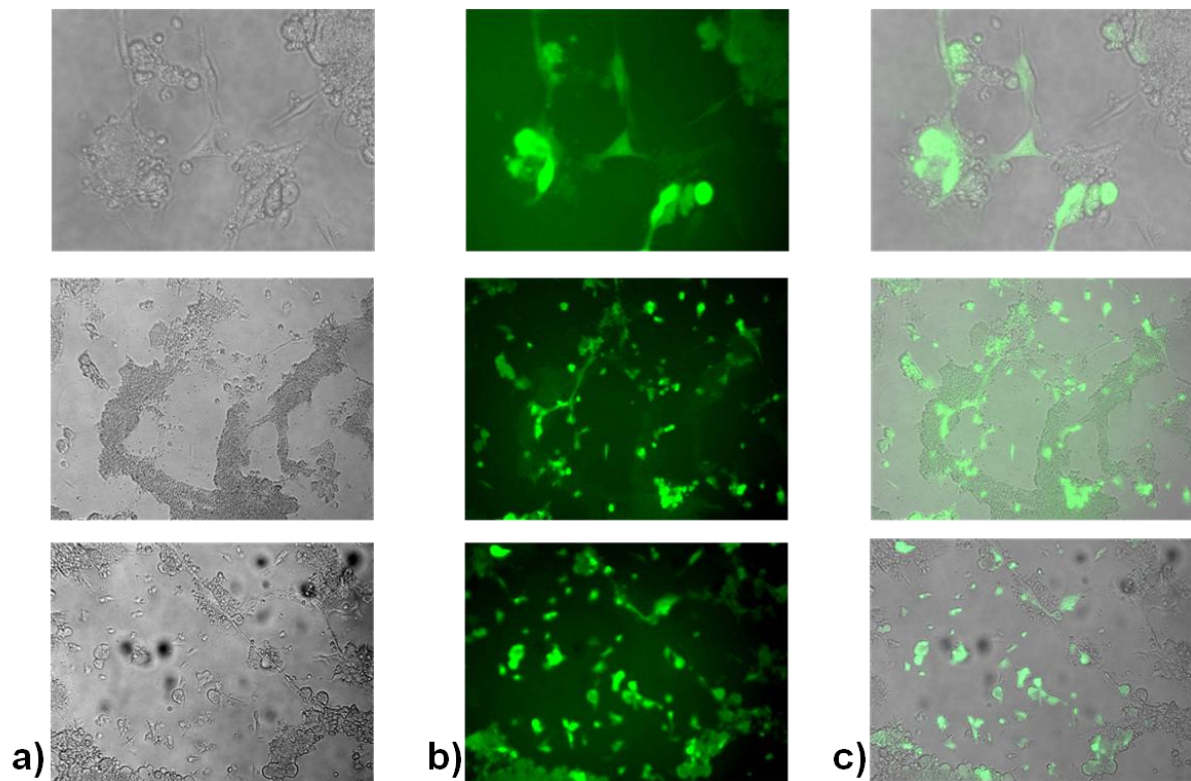


**Abb. 4.26: Nachweis der (a) rekombinanten Vaccinia Virus DNA von vrekFCoV 79-1146, GFP und (b) *in vitro* transkribierten RNA von rekFCoV 79-1146, GFP**

Die rekombinante Vaccinia Virus DNA besitzt eine Größe von > 200 kb; die *in vitro* transkribierte coronavirale RNA ist ca. 30 kb groß.

Die von rekFCoV 79-1146, GFP synthetisierte RNA wurde in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen elektroporiert und mit FCWF-4-Zellen kokultiviert. Der Überstand wurde nach 48 h geerntet und diente für die Infektion von frischen FCWF-4-Zellen. Bereits 24 h p.i. lag ein ZPE in Form einer Zelllyse vor. Der Überstand wurde als Stocklösung für weitere Experimente bei -70°C eingefroren. Anschließend wurde untersucht, ob die eingeführte GFP-Gensequenz über mehrere Passagen stabil in das coronavirale Genom rekFCoV 79-1146 anstelle der Gene 3abc integriert war. Dafür wurde aus infizierten Zellen der Passagen 1-4 Poly-(A)-RNA präpariert und für RT-PCR-Analysen verwendet. Mittels Sequenzierung wurde die stabile Integration des GFP-Gens anstelle der Gene 3abc nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob das GFP-Gen auch stabil heterolog exprimiert wird, wurden FCWF-4-Zellen mit rekFCoV 79-1146,

GFP infiziert (MOI 0,001) und 24h p.i. mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Ein Großteil der infizierten Zellen zeigte eine starke Fluoreszenz (siehe Abb. 4.27).



**Abb. 4.27: Nachweis der GFP-Expression nach Infektion von FCWF-4-Zellen mit rekFCoV 79-1146, GFP**

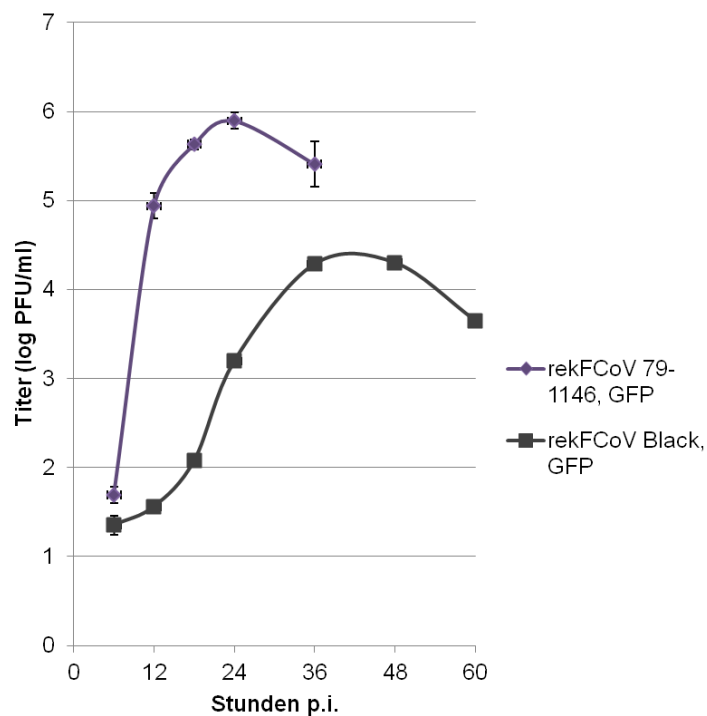
FCWF-4-Zellen wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert. 24h p.i. wurde das Medium abgenommen und die Zellen auf eine grüne Fluoreszenz überprüft. a) Zellen im Durchlicht; b) Fluoreszenz; c) Overlay

Nachdem bestätigt werden konnte, dass das GFP-Gen stabil über mehrere Passagen heterolog exprimiert wird, folgte die Charakterisierung des GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 hinsichtlich Wachstumskinetik und Plaquemorphologie im Vergleich zu dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV Stamm Black (rekFCoV Black, GFP). Das rekombinante Serotyp I GFP-Virus wurde von Dr. Gergely Tekes im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt (Tekes, 2008b). Bei dem phänotypischen Vergleich der GFP-Viren mit dem jeweiligen rekombinanten Ausgangsvirus rekFCoV Black (Tekes, 2008b) bzw. rekFCoV 79-1146 (Daten nicht gezeigt) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Hingegen bestehen deutliche Unterschiede zwischen dem

rekombinanten Serotyp I FCoV Stamm Black und dem rekombinanten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 bzw. zwischen den Wildtypen hinsichtlich Wachstumskinetik und Plaquemorphologie (Tekes, 2008b; siehe Kapitel 4.1.4.2 und 4.1.4.3).

#### 4.2.1.1 Wachstumskinetik

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens des GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV 79-1146 im Vergleich zu dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV Black wurden von beiden Viren die Stocklösungen auf FCWF-4-Zellen austitriert. Anhand der erhaltenen Titer wurden FCWF-4-Zellen in einer 12-Loch Platte mit einer MOI von 0,001 infiziert und die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h) geerntet. Im Anschluss erfolgte erneut eine Titration der Überstände (Abb. 4.28).



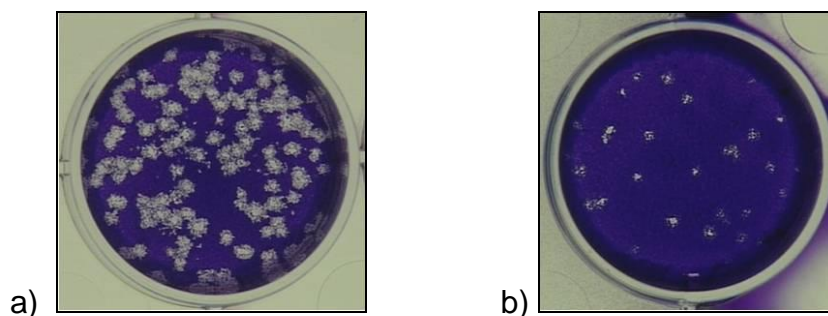
**Abb. 4.28: Wachstumskinetik von rekFCoV 79-1146, GFP im Vergleich zu rekFCoV Black, GFP**

FCWF-4-Zellen wurden mit den Virussuspensionen infiziert (MOI 0,001), der Überstand von rekFCoV 79-1146, GFP 6h, 12h, 18h, 24h und 36h p.i. und von rekFCoV Black, GFP 6h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h und 60h p.i. geerntet und jeweils titriert.

Abbildung 4.28 zeigt wie erwartet, dass sich der Verlauf der Wachstumskinetik sowie die erreichten Titer der rekombinanten GFP-Viren (Serotyp I und II) deutlich voneinander unterscheiden. Während das rekombinante Serotyp II GFP-Virus 12 h p.i. bereits einen durchschnittlichen Titer von  $1 \times 10^5$  PFU/ml aufwies und 24h p.i. den Höhepunkt mit einem Titer im Durchschnitt von  $1 \times 10^6$  PFU/ml erreichte, replizierte das rekombinante Serotyp I GFP-Virus sehr viel langsamer. 12 h p.i. wies dieser einen Titer von ca.  $4 \times 10^1$  PFU/ml auf ( $p < 0,0001$ ) und erreichte einen maximalen Titer von ca.  $2 \times 10^4$  PFU/ml 48h p.i. ( $p < 0,0001$ ). Auch die Titer 18 h p.i. ( $p < 0,0001$ ) und 36 h p.i. ( $p = 0,0016$ ) unterschieden sich im Vergleich zum Serotyp II GFP-Virus signifikant. Das GFP-exprimierende rekombinante Serotyp II FCoV replizierte im Vergleich zu dem GFP-exprimierenden Serotyp I FCoV schneller und erreichte somit höhere Titer.

#### 4.2.1.2 Plaquemorphologie

FCWF-4-Zellen, die mit dem rekombinanten Serotyp II GFP-Virus infiziert wurden, zeigten bereits 24 h p.i. einen ZPE in Form einer Zelllyse. Ein sichtbarer ZPE trat bei den rekombinanten Serotyp I GFP-Virus infizierten Zellen erst 48 h p.i. auf. Die durchschnittliche Plaquegröße von rekFCoV 79-1146, GFP betrug 55 h p.i. 0,823 mm, die von rekFCoV Black, GFP 0,233 mm ( $p > 0,001$ ). Somit waren bei der Plaquemorphologie zwischen dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV und dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV signifikante Unterschiede zu beobachten (siehe Abb. 4.29).



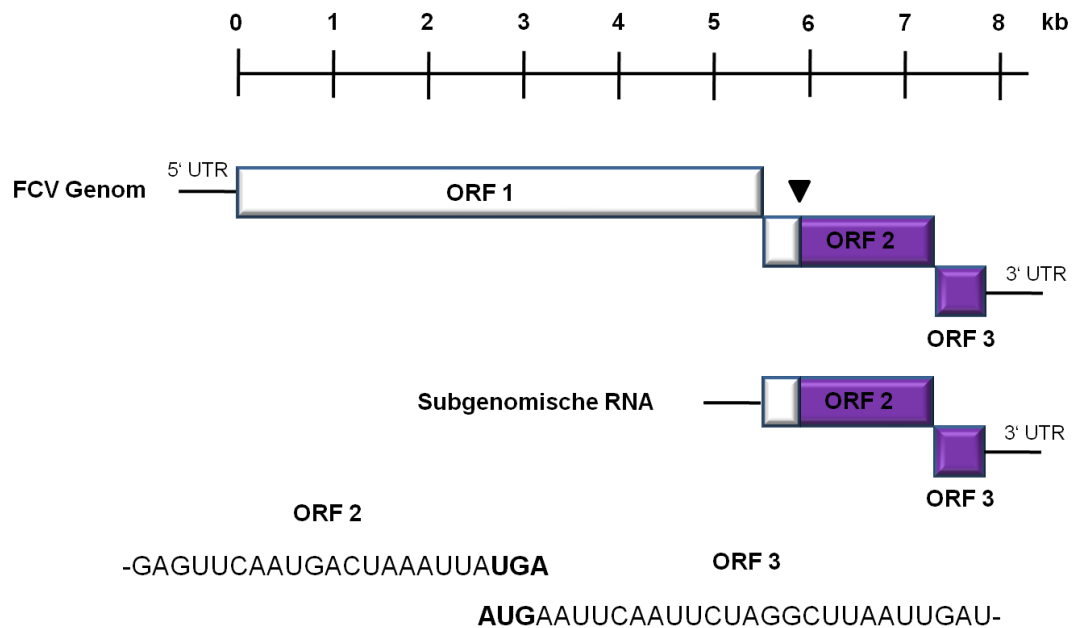
**Abb. 4.29: Plaquemorphologie von (a) rekFCoV 79-1146, GFP im Vergleich zum (b) rekFCoV Black, GFP**

FCWF-4-Zellen wurden mit einer geeigneten Verdünnung der Stocklösung des jeweiligen Virus infiziert, mit Carboxymethylcellulose-Medium überschichtet und für 55 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.



#### 4.2.2 Expression von caliciviralen Genen

Um coronavirale Vektoren als Kandidaten für die Herstellung von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten der Katze zu untersuchen, wurde das rekombinante feline Coronavirus Serotyp I Stamm Black (rekFCoV Black) für die heterologe Expression der Strukturproteingene von dem veterinärmedizinisch bedeutsamen feline Calicivirus (FCV) verwendet. Das feline Calicivirus gehört innerhalb der Familie *Caliciviridae* zum Genus *Vesivirus* und verursacht bei der Katze in erster Linie Erkrankungen des oberen Respirationstraktes. Es besitzt eine einzelsträngige RNA in Plusstrangorientierung mit einer Größe von ca. 7,7 kb. Das Genom enthält drei ORFs; ORF 1 kodiert für ein Nichtstrukturpolyprotein, ORF2 kodiert ein Vorläuferprotein, das nach Abspaltung der N-terminalen 124 Aminosäuren das Kapsidprotein bildet, und ORF 3 kodiert ein kleines, basisches Strukturprotein, dessen weitere Funktion nicht geklärt ist. Da Letzteres vermutlich die Stabilität des Kapsidproteins *in vivo* erhöht (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003), wurde nicht nur ORF 2, sondern auch ORF 3 in das coronavirale Genom eingeführt (siehe Abb. 4.30). Die calicivirale Sequenz stammt aus dem Plasmid pCH1, das uns freundlicherweise von Prof. Dr. Gregor Meyers (Institut für Immunologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid enthält ORF 2 (nt 1-2007) und ORF 3 (nt 2004-2324) des feline Calicivirus Stamm 2024 (Thumfart und Meyers, 2002).



Modifiziert nach Luttermann und Meyers, 2007

#### Abb. 4.30: Genomorganisation des feline Calicivirus

Das Genom beinhaltet drei ORFs. ORF 2 kodiert ein Vorläuferprotein, das nach Abspaltung der ersten 124 Aminosäuren vom N-terminalen Ende das Kapsidprotein bildet. Die Spaltstelle ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. ORF2 und ORF3 überlappen mit vier Nukleotiden und werden von einer subgenomischen RNA exprimiert. Der Teil, der in das FCoV-Genom eingeführt werden soll, ist lila hinterlegt.

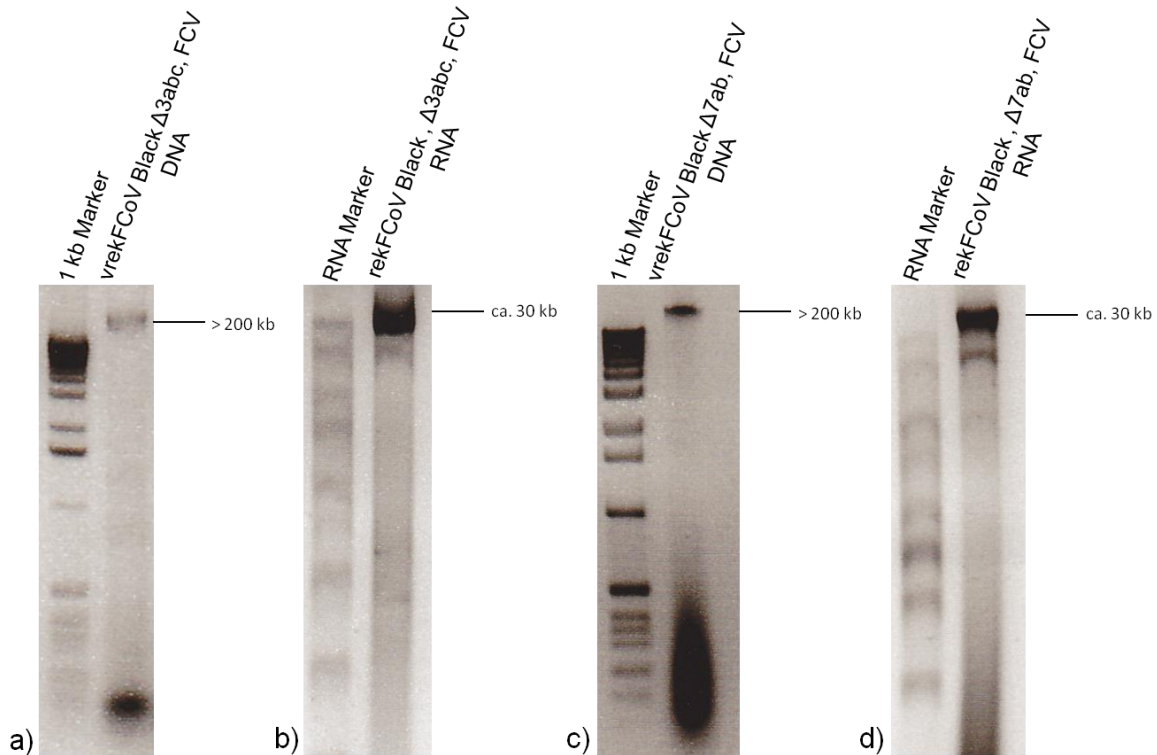
Um zu überprüfen, an welcher Stelle im coronaviralen Genom eine stabile Expression des viralen Fremdgens gewährleistet ist, wurden mit Hilfe des revers-genetischen Systems rekombinante feline Coronaviren hergestellt, die die beiden FCV-ORFs entweder anstelle der gruppenspezifischen Gene 3abc (rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV) besitzt (siehe Abb. 4.31 (a)) oder dessen Gene 7ab durch die FCV-ORFs 2 und 3 ersetzt wurden (rekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV) (siehe Abb. 4.31 (b)).



**Abb. 4.31: (a) rekFCoV Black Δ3abc, FCV und (b) rekFCoV Black Δ7ab, FCV**

Das rekombinante FCoV rekFCoV Black Δ3abc, FCV besitzt anstelle der Gene 3abc den ORF 2 und ORF 3 des feline Calicivirus Stamm 2024 (graue Box) (a). In rekFCoV Black Δ7ab, FCV befinden sich die viralen Fremdgene anstelle der Gene 7ab (b).

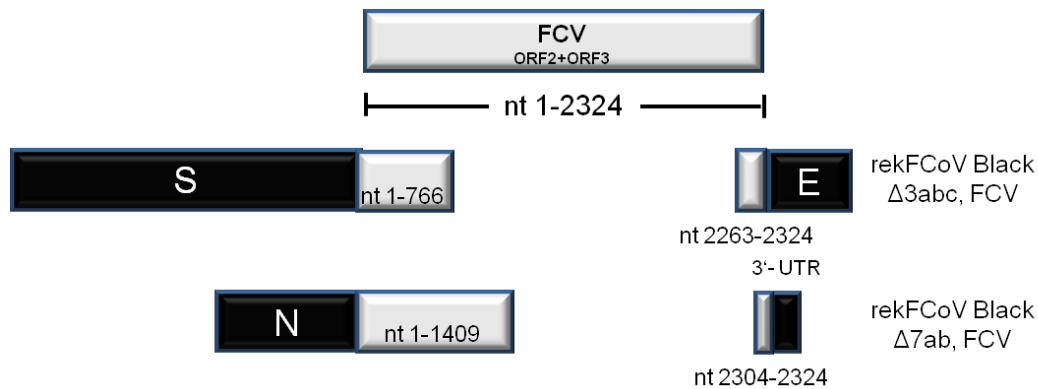
Dr. Gergely Tekes hatte bereits 2006 mit diesem Projekt begonnen. Daher stand sowohl für den Austausch der Gene 3abc als auch der Gene 7ab durch die FCV-Strukturproteingene je ein rekombinantes Vaccinia Virus zur Verfügung, das anstelle der Gene 3abc bzw. 7ab das GPT-Gen enthielt. Auch die Plasmide pGemT 438-7 und pGemT 438-11 (siehe Kapitel 3.7.4, Tab. 3.4) wurden bereits von Dr. Gergely Tekes konstruiert, sodass direkt mit den Negativselektionen begonnen werden konnte. Dafür wurden CV-1-Zellen mit den rekombinanten Vaccinia Viren infiziert und mit dem Plasmid pGemT 438-7 bzw. pGemT 438-11 transfiziert. Nach einer doppelten homologen Rekombination sowie drei Runden Plaquereinigung unter GPT-Negativselektion wurde ein rekombinantes Vaccinia Virus (vrekFCoV Black Δ3abc, FCV bzw. vrekFCoV Black Δ7ab, FCV) isoliert, das die FCV-ORFs 2 und 3 anstatt der coronaviralen Gene 3abc bzw. 7ab aufwies. Für die Gewinnung der rekombinanten FCoVs rekFCoV Black Δ3abc, FCV und rekFCoV Black Δ7ab, FCV wurde, wie in Kapitel 3.1.4.4 beschrieben, eine große Menge an qualitativ hochwertiger DNA von vrekFCoV Black Δ3abc, FCV bzw. vrekFCoV Black Δ7ab, FCV aus infizierten BHK-21-Zellen präpariert (siehe Abb. 4.32 (a) und (c)). Nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Cla*I wurde die rekombinante Vaccinia Virus DNA *in vitro* transkribiert (siehe Abb. 4.32 (b) und (d)).



**Abb. 4.32: Nachweis der rekombinanten Vaccinia Virus DNA von (a) vrekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV und (c) vrekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV sowie der *in vitro* transkribierten RNA von (b) rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV und (d) rekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV**

Die rekombinante Vaccinia Virus DNA besitzt eine Größe von > 200 kb; die *in vitro* transkribierte coronavirale RNA ist ca. 30 kb groß.

Nach Elektroporation der RNA von rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV bzw. rekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV in BHK<sub>FCoV-N</sub>-Zellen erfolgte eine Kokultivierung mit FCWF-4-Zellen. Der Überstand wurde nach 48 h geerntet und für die Infektion von frischen FCWF-4-Zellen verwendet. Beide rekombinanten Viren replizierten sehr langsam und führten erst 96 h p.i. zu einem ZPE. Der Überstand wurde als Stocklösung für weitere Experimente bei -70°C eingefroren. Um zu untersuchen, ob die eingeführten Fremdgene über mehrere Passagen stabil in das coronavirale Genom rekFCoV integriert waren, wurde aus infizierten Zellen der Passagen 1-4 Poly-(A)-RNA für RT-PCR-Analysen präpariert. Die betroffenen Rekombinationsstellen sowie der calicivirale ORF 2 und ORF 3 wurden amplifiziert und sequenziert. Beide rekombinanten Viren wiesen bereits nach der ersten Passage große Deletionen in den Strukturproteingensequenzen auf (siehe Abb. 4.33).



**Abb. 4.33: Schematische Darstellung der Deletionen im caliciviralen ORF 2 und ORF 3 von rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV und rekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV**

Nach der Gewinnung der beiden rekombinanten Viren konnte mit Hilfe der Sequenzierung bei rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV eine 1,497 kb große Deletion und bei rekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV eine 0,895 kb große Deletion in den eingeführten caliciviralen Genen festgestellt werden. ORF 2 + ORF 3 von FCV besitzen zusammen eine Größe von 2,324 kb.

Die Sequenzierung der Rekombinationsstellen und der FCV-ORFs 2 und 3 zeigte, dass die caliciviralen Gene weder anstelle der Gene 3abc noch anstelle der Gene 7ab stabil in das coronavirale Genom eingebaut werden konnten. Die doppelte homologe Rekombination war in beiden Fällen erfolgreich, jedoch wurde jeweils ein mittig gelegener großer Sequenzbereich der eingefügten heterologen Sequenz deletiert. Bei rekFCoV Black  $\Delta$ 3abc, FCV befand sich bereits nach der ersten Passage nur noch der Bereich nt 1-766 und nt 2263-2324 der Fremdgene in dem coronaviralen Genom; ca. 1,5 kb wurden deletiert. RekFCoV Black  $\Delta$ 7ab, FCV wies eine ca. 0,9 kb große Deletion auf. Die Bereiche nt 1-1409 und nt 2304-2324 waren integriert.

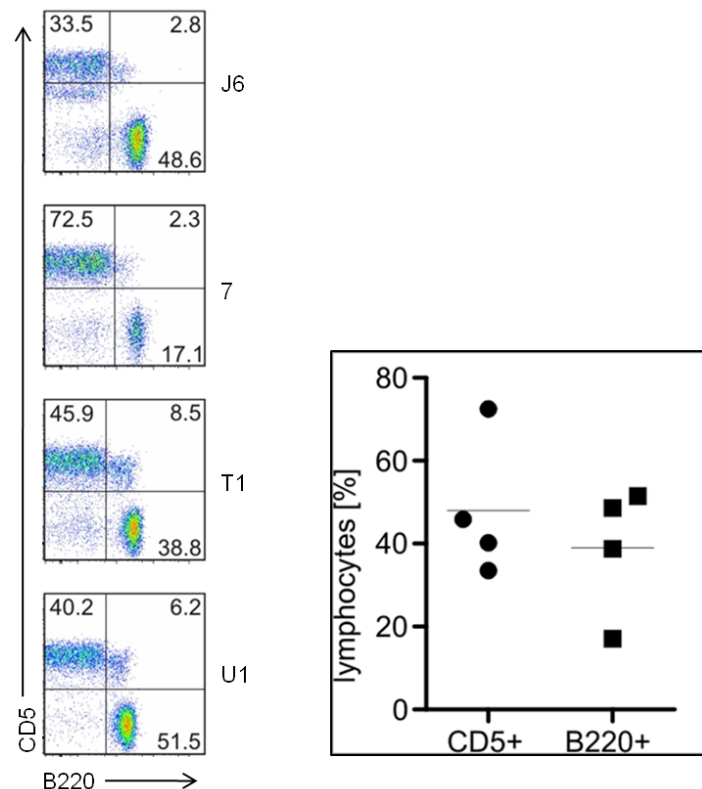
#### 4.3 Treffzellen für feline Coronaviren

Feline Coronaviren sind für ihr Potenzial, ihren Zelltropismus zu ändern, bekannt. Dieser Tropismuswechsel geht mit einer Veränderung der Pathogenität einher. Während sich FECV primär in Epithelzellen des Intestinaltraktes vermehrt, weist FIPV einen verstärkten Tropismus für Monozyten/Makrophagen auf. Eine effiziente Replikation in Monozyten/Makrophagen ist für die Pathogenese von FIP von zentraler Bedeutung (Stoddart und Scott, 1989). Jedoch haben Infektionsstudien mit

Serotyp I und Serotyp II FIPVs gezeigt, dass sich nur ein geringer Prozentsatz dieser Zellen infizieren lässt (Dewerchin et al., 2005; Tekes et al., 2008a). Daher stellt sich die Frage, ob auch andere Blutzellen mit FIPV infiziert werden können und somit als Treffzellen in Frage kommen. Für den Nachweis der zellulären Treffzellen von FIPVs wurden feline Leukozyten aus dem peripheren Blut (PBMC: Lymphozyten, Monozyten) gewonnen, analysiert und sowohl mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV als auch mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV infiziert.

#### 4.3.1 Isolierung und Analyse von feline PBMC

Für die Analyse von feline Lymphozyten und Monozyten wurden zunächst von vier SPF (*specific pathogen free*)- Katzen (J6, 7, T1, U1), die seronegativ für feline Coronaviren waren, PBMC über einen Ficoll-Paque isoliert (siehe Kapitel 3.6.7.1). Der prozentuale Anteil an T- und B-Zellen in der Lymphozytenpopulation der feline PBMC wurde mit Hilfe des FACS ermittelt (siehe Abb. 4.34). Die Identifizierung der Lymphozytenpopulation erfolgte unter Verwendung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts. Für die FACS-Analyse wurden je Katze  $0,5 \times 10^6$  Zellen mit den Antikörpern anti-CD5, FITC konjugiert (spezifisch gegen T-Zellen) und anti-B220/CD45R, PerCP konjugiert (spezifisch gegen B-Zellen) gefärbt. Im Durchschnitt sind ca 50% der feline Lymphozyten in den PBMC Träger von CD5, einem für T-Zellen spezifischen Oberflächenmolekül. Etwa 40% der feline Lymphozyten in den PBMC exprimieren B220, ein für B-Zellen spezifisches Oberflächenmolekül. Träger von CD5 sowie B220 sind ca. 5% der Lymphozyten in den PMBCs. 10% der Lymphozyten exprimieren weder CD5 noch B220 (siehe Abb. 4.34).

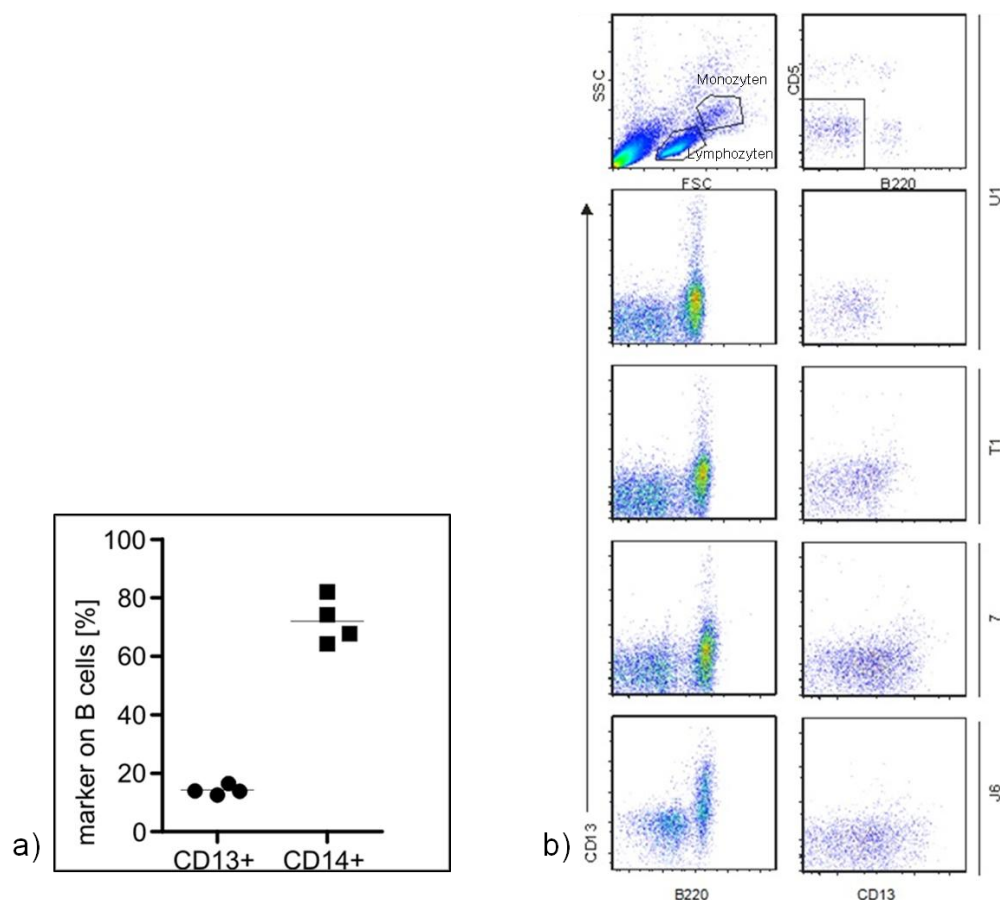


**Abb. 4.34: Verteilung der T- und B-Zellen in feline Blutzellen**

Mit Hilfe des FACS konnte der durchschnittliche prozentuale Anteil von T- und B-Zellen in den feline Lymphozyten ermittelt werden. Dafür wurde ein Teil der isolierten PBMC sowohl mit dem murinen FITC-markierten Antikörper anti-CD5 (1:1000), der spezifisch gegen Oberflächenmoleküle der feline T-Zellen gerichtet ist, als auch mit dem PerCP-markierten Antikörper aus der Ratte anti-B220/CD45R (spezifisch gegen Oberflächenmoleküle der B-Zellen) (1:500) gefärbt.

Desweiteren erfolgte die Ermittlung des prozentualen Anteils von CD13- und CD14-positiven B-Zellen (siehe Abb. 4.35 (a)). Für die Analyse wurden aus den feline PBMC CD13- und CD14-positive Zellen mit Hilfe der magnetischen Markierung isoliert (siehe Kapitel 3.6.7.3) und mit den Antikörpern anti-B220/CD45R, PerCP konjugiert (spezifisch gegen B-Zellen), anti-CD13, APC konjugiert (spezifisch gegen CD13, fAPN) und anti-CD14, Biotin konjugiert (spezifisch gegen CD14) (Nachweis über SA-PC7) gefärbt. Im Durchschnitt waren 20% der B220-positiven Zellen Träger des Oberflächenmoleküls CD13 und 70% der B220-positiven Zellen waren positiv für CD14. Die restlichen 10% waren weder positiv für CD13 noch für CD14. Nach Sladek und Rysanek (2008) wird das Oberflächenmolekül CD14 vorwiegend auf Monozyten/Makrophagen exprimiert. Um zu untersuchen, in welchen mononukleären Zellen des peripheren Blutes CD13, der zelluläre Rezeptor für Serotyp II FCoV, s

exprimiert wird, erfolgte die Färbung der PBMC mit den Antikörpern anti-B220/CD45R, PerCP konjugiert, anti-CD5, FITC konjugiert und anti-CD13, APC konjugiert (spezifisch gegen CD13). Die CD13-Expression wurde in der Monozytenpopulation sowie in der Lymphozytenpopulation analysiert (siehe Abb. 4.35 (b)). Die FACS-Analysen zeigen, dass in den vier Katzen U1, T1, 7, J6 die Hauptpopulation, die den zellulären Rezeptor (CD13) für Serotyp II FCoV exprimiert, aus B220-positiven Zellen bestand (durchschnittlich ca. 20%). Die Monozyten exprimierten kaum CD13 (durchschnittlich ca. 1,5%) und die CD5-positiven Zellen waren negativ für CD13 (Daten nicht gezeigt).



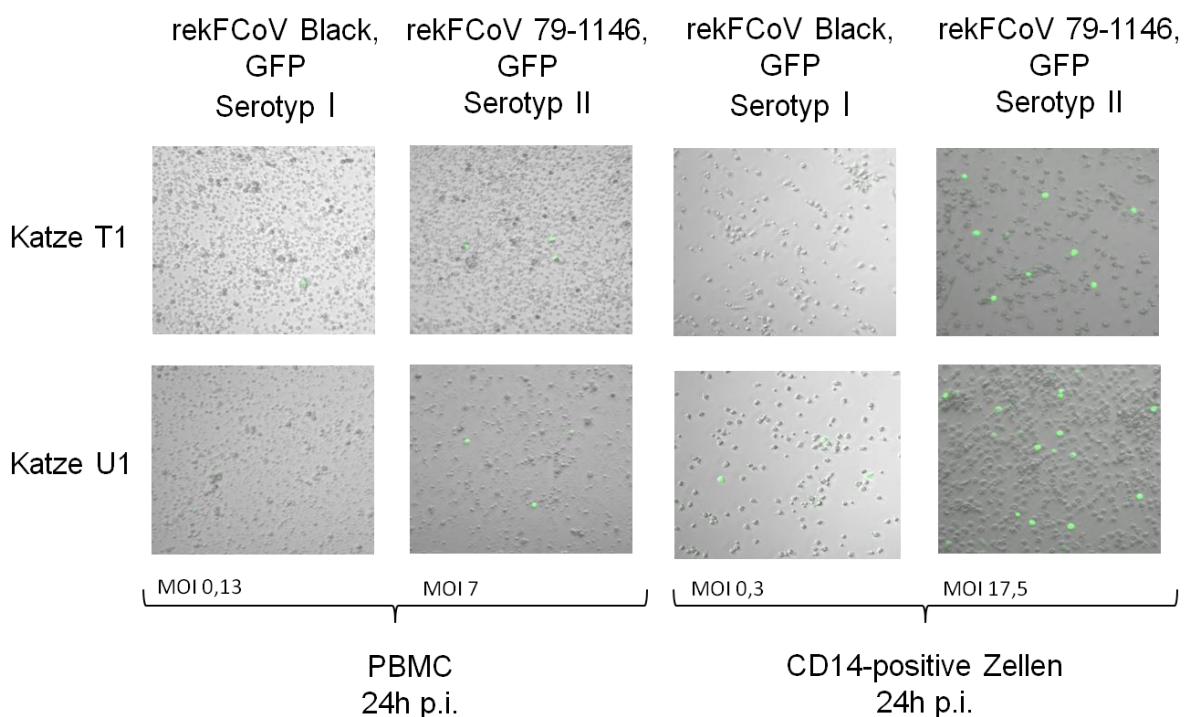
**Abb. 4.35: Expression von CD13 und CD14**

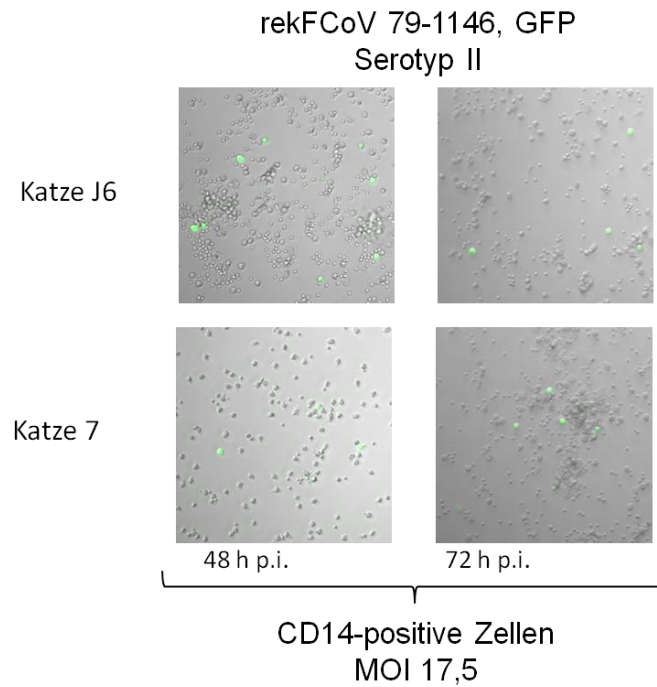
Mit Hilfe des FACS konnte (a) der prozentuale Anteil von B220-positiven Zellen, die CD13 und CD14 exprimieren, ermittelt und (b) die CD13-Expression in B220-positiven Zellen und Monozyten/Makrophagen gezeigt werden. Dafür wurden aus der PBMC-Suspension CD13- und CD14-positive Zellen isoliert und mit den Antikörpern anti-B220/CD45R, PerCP konjugiert (spezifisch gegen B-Zellen) (1:500), anti-CD5, FITC konjugiert (1:1000), anti-CD13, APC konjugiert (spezifisch gegen CD13, fAPN) (1:1000) und anti-CD14, Biotin konjugiert (spezifisch gegen CD14) (1:100) (Nachweis über SA-PC7) gefärbt. In Abb. 4.35(b) oben links sind die Lymphozyten- und die Monozytenpopulation markiert.



#### 4.3.2 Infektion von feline PBMC und CD14-positiven Zellen mit rekFCoV 79-1146, GFP

Für die Analyse der Treffzellen von feline Coronaviren wurden in dem ersten Infektionsversuch frisch isolierte PBMC und CD14-positive Zellen der PBMC der vier SPF-Katzen (T1, U1, J6, 7) sowohl mit dem GFP-exprimierenden Serotyp II FCoV als auch mit dem GFP-exprimierenden Serotyp I FCoV infiziert. Die Isolierung der CD14-positiven Zellen aus den PBMC erfolgte mittels magnetischer Markierung (siehe Kapitel 3.6.7.3). Aufgrund der FACS-Analysen hinsichtlich der CD14-Expression in B-Zellen konnte das Oberflächenmolekül CD14 nicht mehr als spezifischer Marker für Monozyten/Makrophagen angesehen werden. In der CD14-positiven Zellpopulation befanden sich somit Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Da das rekombinante Serotyp I GFP-Virus nur einen maximalen Titer von  $1,3 \times 10^5$  PFU/ml erreicht hatte, konnte im Vergleich zu dem rekombinanten Serotyp II GFP-Virus ( $7 \times 10^6$  PFU/ml) nur mit einer relativ geringen MOI infiziert werden. Die Infektion der PBMC mit rekFCoV Black, GFP erfolgte mit einer MOI von 0,13; mit rekFCoV 79-1146, GFP mit einer MOI von 7. Die Infektion von CD14-positiven Zellen mit rekFCoV Black, GFP erfolgte mit einer MOI von 0,3; mit rekFCoV 79-1146, GFP mit einer MOI von 17,5. Die Zellen wurden anschließend 24 h, 48 h und 72 h p.i. mittels Fluoreszenzmikroskopie auf GFP-Expression untersucht (siehe Abb. 4.36).





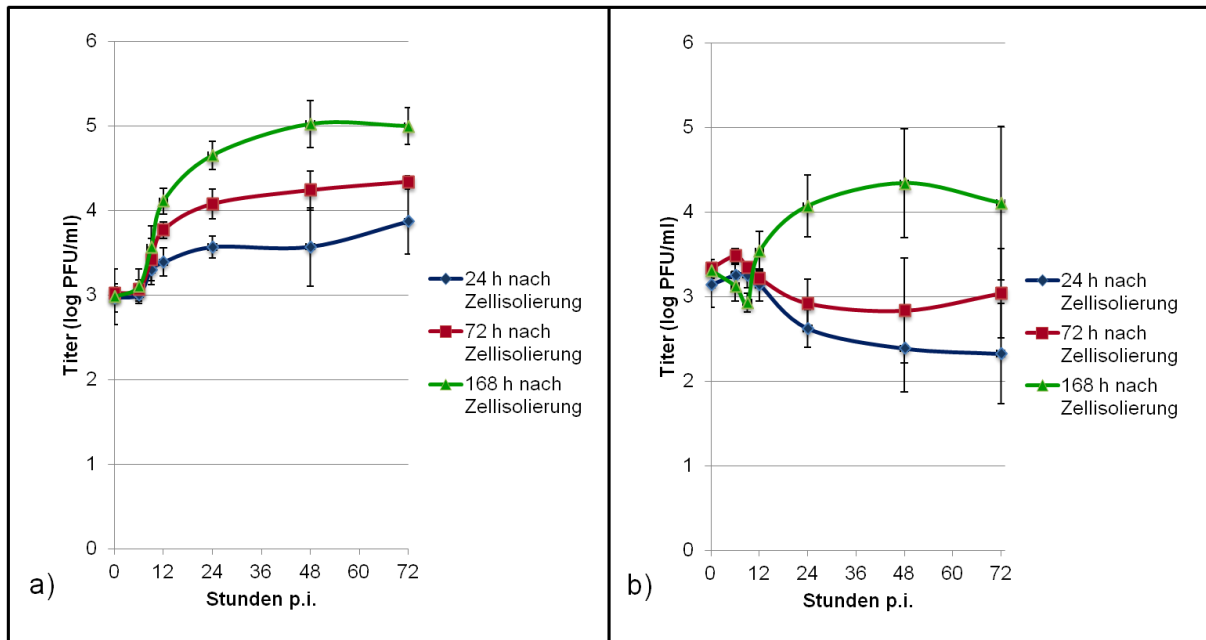
**Abb. 4.36: Infektion von feline PBMC sowie CD14-positiven Zellen mit GFP-exprimierenden rekombinanten FCoV**

Feline PBMC sowie CD14-positive Zellen von den SPF-Katzen U1, T1, J6 und 7 wurden mit rekFCoV Black, GFP mit einer MOI von 0,13 bzw. 0,3 und mit rekFCoV 79-1146, GFP mit einer MOI von 7 bzw. 17,5 infiziert. 24 h, 48 h und 72 h p.i. wurden die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Vergrößerung von 1:10 auf GFP-Expression untersucht.

Nach Inkubation mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV konnte sowohl bei den PBMC als auch bei den CD14-positiven Zellen zu keinem Zeitpunkt eine GFP-Expression detektiert werden. Im Gegensatz zu dem Serotyp I GFP-Virus wurde eine GFP-Expression bei wenigen der CD14-positiven Zellen nach Inkubation mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV festgestellt. Der Prozentsatz Serotyp II FCoV infizierter PBMC war so gering, dass kaum eine GFP-Expression detektiert werden konnte.

Ein weiterer Infektionsversuch erfolgte mit Zellen von vier verschiedenen FCoV-seropositiven Katzen. Diesmal wurden Monozyten/Makrophagen und CD14-positive Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach ihrer Isolierung aus dem Katzenblut (24 h, 72 h und 168 h) mit rekFCoV 79-1146, GFP (MOI 2) infiziert. Die Monozyten/Makrophagen wurden mit Hilfe der Plastikadhärenz (siehe Kapitel 3.6.7.2), die CD14-positiven Zellen mittels magnetischer Markierung (siehe Kapitel 3.6.7.3) aus den feline PBMC isoliert. Für den Nachweis der Replikation des

rekombinanten Serotyp II GFP-Virus in den Zellen wurden nach jeder Infektion die Überstände der infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) geerntet und als Ausgangsmaterial für die Titerbestimmung verwendet (siehe Kapitel 3.7.1 und Abb. 4.37).



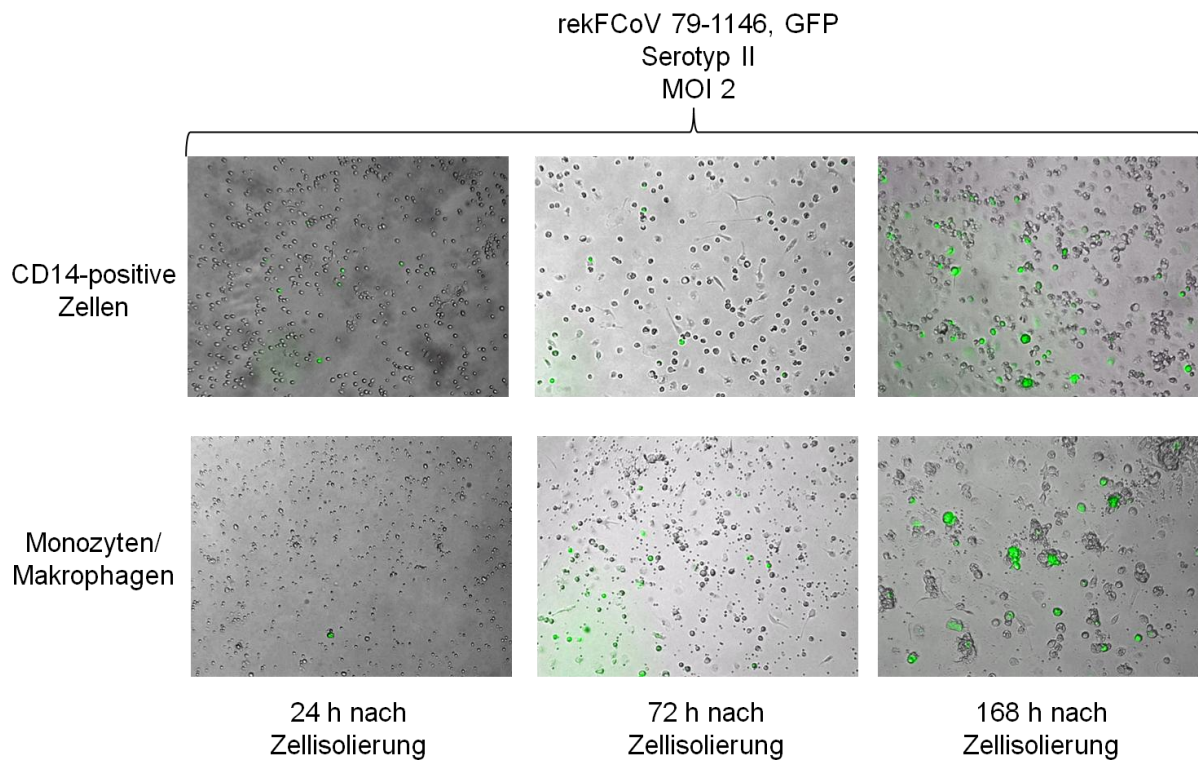
**Abb. 4.37: Wachstumskinetik von rekFCoV 79-1146, GFP in feline Blutzellen**

(a) Monozyten/Makrophagen und (b) CD14-positive Zellen wurden mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV jeweils 24 h (erster Infektionsversuch), 72 h (zweiter Infektionsversuch) und 168 h (dritter Infektionsversuch) nach ihrer Kultivierung mit einer MOI von 2 infiziert und die Überstände 0h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i. geerntet und titriert.

In Abbildung 4.37(a) ist zu sehen, dass zu allen drei Zeitpunkten (24 h, 72 h, 168 h) nach der Zellisolierung eine Replikation des GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV in den isolierten Monozyten/Makrophagen detektiert werden konnte. Der Ausgangstiter zum Zeitpunkt Null lag nach jeder Infektion durchschnittlich bei  $1 \times 10^3$  PFU/ml. Der relativ hohe Titer zum Zeitpunkt Null kam dadurch zustande, da die Zellen (Monozyten/Makrophagen und CD14-positive Zellen) nach Inkubation mit dem Virus nicht gewaschen wurden und die Virussuspension somit auf den Zellen blieb. Der Waschschrift bei diesen Infektionsversuchen wurde weggelassen, da sich die CD14-positiven Zellen zum Teil in Suspension befanden. Um die beiden Zellpopulationen miteinander vergleichen zu können, wurden die adhären-

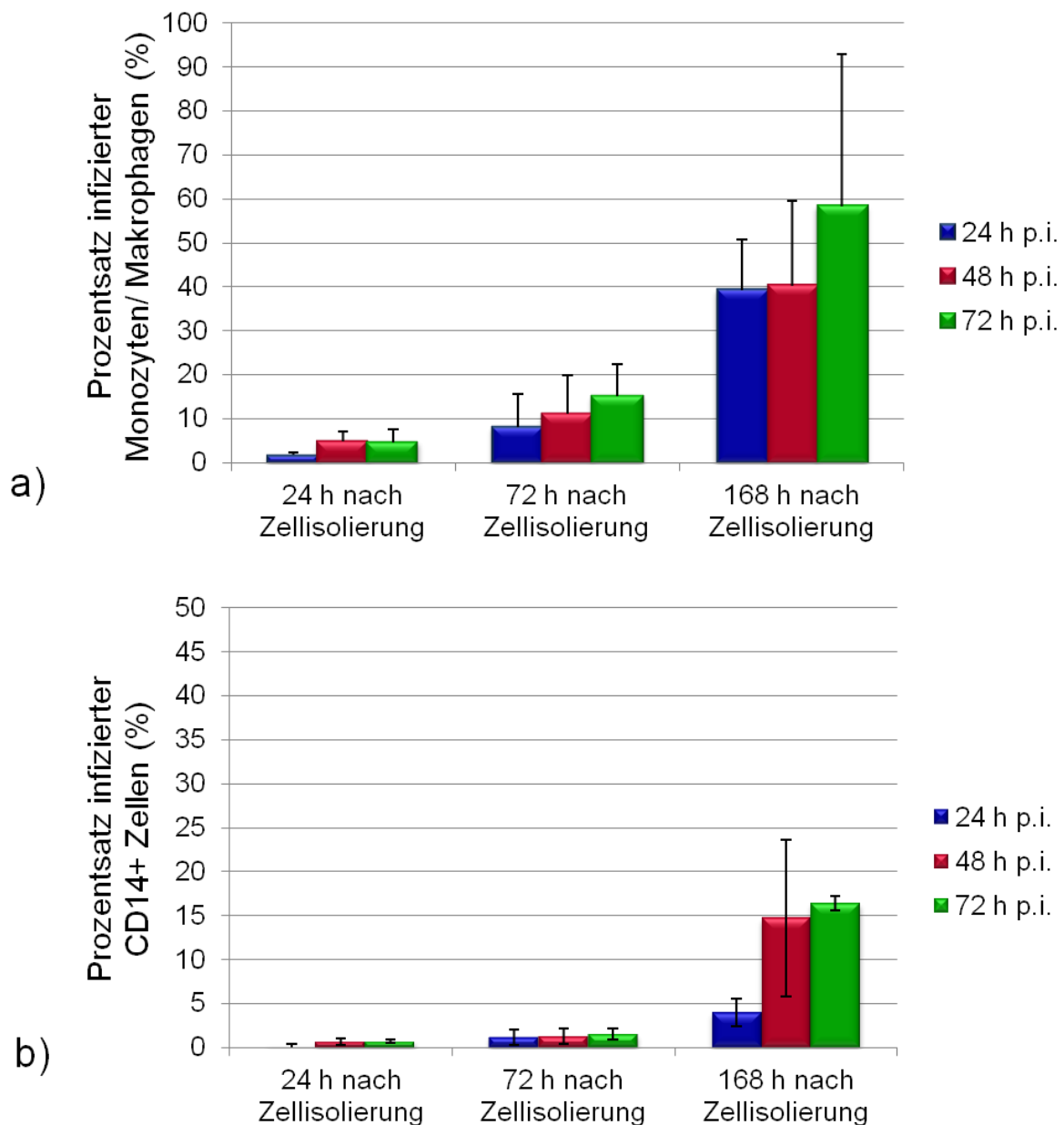
Monozyten/Makrophagen gleich behandelt. Während die Vermehrung in den Monozyten/Makrophagen, die 24 h nach der Kultivierung infiziert wurden, sehr gering war, nahmen die Titer bei den Zellen, die 72 h und 168 h nach der Kultivierung infiziert wurden, deutlich zu. So stieg der Titer im ersten Infektionsversuch 12 h p.i. auf  $3 \times 10^3$  PFU/ml und erreichte 72 h p.i. einen maximalen Titer von durchschnittlich ca.  $1 \times 10^4$  PFU/ml. Im Vergleich mit dem Ausgangstiter wurde ein Zuwachs von einer  $\log_{10}$ -Stufe erreicht. Wurden die Monozyten/Makrophagen 72 h nach der Isolierung infiziert, wurde 12 h p.i. im Durchschnitt ein Titer von ca.  $6 \times 10^3$  PFU/ml erreicht und 72 h p.i. ein maximaler Titer von  $2,5 \times 10^4$  PFU/ml. Die erreichten Titer aus dem dritten Infektionsversuch unterschieden sich signifikant von den Titern, die im ersten Infektionsversuch erreicht wurden. Bereits 12 h p.i. stieg der Titer auf ca.  $1,5 \times 10^4$  PFU/ml ( $p < 0,001$ ) und erreichte 72 h p.i. einen Wert von ca.  $1 \times 10^5$  PFU/ml ( $p = 0,002$ ). Dies sind zwei  $\log_{10}$ -Stufen höher als die Ausgangskonzentration und eine  $\log_{10}$ -Stufe höher im Vergleich zum ersten Infektionsversuch. In den drei Infektionsversuchen stiegen die Titer kontinuierlich an und erreichten in den ersten beiden Versuchen 72 h p.i. und im dritten Versuch 48 h p.i. den höchsten gemessenen Titer. Die Abbildung 4.37(b) zeigt die Wachstumskinetik des GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV in CD14-positiven Zellen in den drei Infektionsversuchen. Die durchschnittliche Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt Null lag hier bei ca.  $1,4 \times 10^3$  PFU/ml. In den ersten beiden Infektionsversuchen (24 h und 72 h nach Zellisolierung) konnte nur eine vernachlässigbar geringe Replikation des GFP-Virus in den ersten 9 h p.i. festgestellt werden. Im ersten Infektionsversuch stieg der Titer 9 h p.i. minimal auf  $1,9 \times 10^3$  PFU/ml bzw. auf  $3,02 \times 10^3$  PFU/ml im zweiten Infektionsversuch. Ab 12 h p.i. nahmen der Titer kontinuierlich ab und sanken unter den Ausgangstiter. Im Gegensatz zu den ersten beiden Infektionsversuchen konnte eine deutliche Replikation in den CD14-positiven Zellen detektiert werden, wenn sie 168 h nach ihrer Isolierung infiziert wurden. Während in den ersten 9 h p.i. keine Vermehrung stattfand, stieg der Titer 12 h p.i. auf  $3,8 \times 10^3$  PFU/ml und erreichte 48 h p.i. ein Maximum von  $4,6 \times 10^4$  PFU/ml. Dies ist über eine  $\log_{10}$ -Stufe höher als die Ausgangskonzentration.

Unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie wurde zudem nach jeder Infektion die GFP-Expression in den Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) überprüft (siehe Abb. 4.38) und der Prozentsatz infizierter Zellen semi-quantitativ ermittelt (siehe Abb. 4.39).



**Abb. 4.38: GFP-Expression in feline Monozyten/Makrophagen sowie CD14-positiven Zellen**

Feline Monozyten/Makrophagen sowie CD14-positive Zellen wurden mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV jeweils 24 h, 72 h und 168 h nach ihrer Kultivierung mit einer MOI von 2 infiziert und 24 h, 48 h und 72 h p.i. mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer 20-fachen Vergrößerung auf GFP-Expression überprüft.



**Abb. 4.39: Prozensatz positiver Zellen nach Infektion mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV**

(a) Monozyten/Makrophagen und (b) CD14-positive Zellen wurden mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV jeweils 24 h, 72 h und 168 h nach ihrer Kultivierung mit einer MOI von 2 infiziert und der Prozensatz infizierter Zellen 24 h, 48 h und 72 h p.i. semiquantitativ ermittelt.

Die Abbildungen 4.38 und 4.39 zeigen, dass im ersten Infektionsversuch (24 h nach Zellisolierung) nach Inkubation mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV nur bei wenigen Monozyten/Makrophagen und CD14-positiven Zellen eine GFP-Expression mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert werden konnte. Der

Prozentsatz infizierter Monozyten/Makrophagen lag 24 h p.i. bei 1,7%, 48 h p.i. bei 4,8% und 72 h p.i. bei 4,7% und unterschied sich bereits 24 h nach der Zellisolierung signifikant von dem Prozentsatz infizierter CD14-positiver Zellen. Bei den CD14-positiven Zellen konnten 24 h p.i. durchschnittlich 0,2% ( $p = 0,008$ ), 48 h p.i. 0,7% ( $p = 0,01$ ) und 72 h p.i. ebenfalls 0,7% ( $p = 0,037$ ) infiziert werden. Im zweiten Infektionsversuch zeigten weiterhin nur wenige der CD14-positiven Zellen eine GFP-Expression; die Anzahl grün fluoreszierender Monozyten/Makrophagen hingegen nahm deutlich zu. Während 24 h p.i. bereits durchschnittlich 8,1% der Monozyten/Makrophagen infiziert werden konnten, betrug der Prozentsatz infizierter CD14-positiver Zellen nur 1,2% ( $p = 0,115$ ). Auch 48 h und 72 h p.i. wurden nur ca. 1% der CD14-positiven Zellen infiziert. Der Prozentsatz infizierter Monozyten/Makrophagen lag 48 h p.i. bereits durchschnittlich bei 11,2% ( $p = 0,065$ ) und 72 h p.i. bei 15,2% ( $p = 0,009$ ). Der höchste Prozentsatz infizierbarer Zellen wurde jeweils erreicht, wenn die CD14-positiven Zellen und die Monozyten/Makrophagen 168 h nach ihrer Kultivierung infiziert wurden. Durchschnittlich 39,3% der Monozyten/Makrophagen wurden 24 h p.i. infiziert. 48 h p.i. stieg der Prozentsatz infizierter Monozyten/Makrophagen auf 40,2% und erreichte 72 h p.i. ein Maximum von 58,4%. Von den CD14-positiven Zellen wurden im Durchschnitt 4% ( $p < 0,001$ ) 24 h p.i. infiziert. 48 h p.i. stieg der Prozentsatz deutlich auf 14,7% ( $p = 0,053$ ) infizierter Zellen an und erreichte 72 h p.i. 16,4% ( $p = 0,051$ ). Die Versuche ergaben, dass die Empfänglichkeit der Monozyten/Makrophagen und CD14-positiven Zellen für die Infektion mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV zunahm, je länger sie sich zum Zeitpunkt der Infektion in Kultur befanden. Sowohl der Prozentsatz infizierbarer Zellen als auch die Virustiter nahmen zu. Zudem wurde beobachtet, dass die CD14-positive Zellpopulation zum Zeitpunkt der Infektion, 168 h nach ihrer Isolierung, hauptsächlich aus Makrophagen bestand, gut zu erkennen an ihrer charakteristischen Morphologie. Die restlichen Zellen der CD14-positiven Zellpopulation starben größtenteils bereits 72 h nach ihrer Isolierung ab. Somit sind der Anstieg des Virustiters sowie die Zunahme an infizierbaren Zellen auf die effiziente Replikation in einer definierten Zellpopulation, den Monozyten/Makrophagen, zurückzuführen.

## 5. Diskussion

Feline Coronaviren gehören zu der Familie *Coronaviridae* und sind weltweit zu finden. Infektionen mit diesem Virus können bei Katzen klinisch inapparent verlaufen oder zu einer tödlichen Krankheit, der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP), führen. FIP ist eine der wichtigsten viralen Krankheiten bei Katzen. Basierend auf serologischen Eigenschaften können FCoV in Typ I und Typ II FCoV eingeteilt werden (Pedersen et al., 1984). 80-90% der FCoV-Infektionen werden durch Serotyp I FCoV verursacht (Hohdatsu et al., 1992; Kennedy et al., 2002; Addie et al., 2003; Kummrow et al., 2005; Lin et al., 2008). Typ II FCoV sind durch Rekombination zwischen Typ I FCoV und dem nah verwandten caninen Coronavirus (CCoV) entstanden. Durch Rekombination wurden das S-Gen und angrenzende Regionen von Typ I FCoV durch die korrespondierenden Teile des CCoV-Genoms ersetzt (Motokawa et al., 1996; Herrewegh et al., 1998). Beide Serotypen existieren als zwei Biotypen, wobei sich das hochvirulente Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV) durch Mutation aus dem harmlosen Feline Enterale Coronavirus (FECV) während einer persistenten Infektion in der infizierten Katze entwickelt (Pedersen et al., 1984; Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Es ist noch nicht geklärt, welche Mutation(en) für den Biotypwechsel verantwortlich ist (sind). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der virulente Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 für die Untersuchung der Pathogenese von FIP und für die Analyse der Treffzellen von FCoV verwendet. Nach Einführung einer genomlangen cDNA-Kopie des FCoV Stamms 79-1146 in einen Vaccinia Virus Vektor, der die Herstellung rekombinanter Serotyp II FCoV erlaubt, wurde ein Infektionsversuch mit Katzen mit dem rekombinanten Serotyp II FCoV durchgeführt. Desweiteren wurden feline Coronaviren als Vektor für die heterologe Genexpression eingesetzt. Abschließend erfolgte eine Analyse der Treffzellen von FCoV unter Verwendung von GFP-exprimierenden rekombinanten FCoV.



### 5.1 Genomorganisation von Serotyp II FCoV 79-1146

Im Jahr 2005 veröffentlichten Haijema et al. die komplette Genomsequenz von FIPV 79-1146. Die virale RNA besitzt eine Länge von 29355 Nukleotiden und trägt wie alle Coronaviren am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz (de Haan et al., 2003; Haijema et al., 2003) sowie nichttranslatierte Regionen (UTR) sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende (310 bzw. 275 nt). Das Replikasegen nimmt mehr als zwei Drittel des FIPV 79-1146 Genoms ein und besteht aus den überlappenden ORFs 1a und 1ab. Die kodierten Polyproteine pp1a und pp1ab werden durch viruskodierte Proteasen ko- und posttranslational in 16 Nichtstrukturproteine (nsp) prozessiert (Dye und Siddell, 2005; Haijema et al., 2005). Neben dem Replikasegen beinhaltet das FIPV 79-1146 Genom neun weitere ORFs, die die Strukturproteine S, E, M und N sowie die gruppenspezifischen akzessorischen Proteine 3abc und 7ab kodieren. Alle Gene *downstream* von ORF 1b werden über ein „*nested set*“ von subgenomischen mRNAs exprimiert. Jede mRNA ist mit einer 90 nt-langen Leader-Sequenz versehen. Die mRNA-Synthese wird durch Transkription-regulierende Sequenzelemente (TRS) reguliert (Zuniga et al., 2004). Die in felineen Coronaviren hoch konservierte TRS enthält das Motiv 5'-CUAAAC-3' (Woo et al., 2010). Die Anzahl der TRS korreliert mit der Anzahl der produzierten mRNAs (Dye und Siddell, 2005). Bei FIPV 79-1146 werden sechs subgenomische mRNAs gebildet (de Groot et al., 1987a; de Groot und Horzinek, 1995; Dye und Siddell, 2005); TRS befinden sich am 5'-terminalen Ende des Genoms (nt 91-98) sowie *upstream* der Gene S, 3a, E, M, N und 7a (Haijema et al., 2007). ORF 3a und 3b formen eine eigene Transkriptionseinheit, wobei die TRS *upstream* des ORF 3a die Transkription der RNA 3 reguliert. Beide ORFs sind nicht nur in FCoV-, sondern auch in CCoV- und TGEV-Stämmen sowie in Infektiöse Bronchitis Virus (IBV)-, Truthahn Coronavirus (TCoV)- und Fasanen Coronavirus (PhCoV)-Stämmen konserviert (Liu et al., 1991; Cavanagh et al., 2001; Cavanagh et al., 2002; Lin et al. 2004; Haijema et al., 2007). ORF 3c ist das einzige akzessorische Gen, für das in allen Alphacoronaviren Homologien gefunden wurden. Mit Hilfe von Sequenzanalysen von FCoV-Stämmen, deren komplette Genomsequenz bekannt ist, konnte das Vorhandensein einer TRS auch für das 3c-Gen in den meisten FCoV Stämmen (Serotyp I und II) gezeigt werden (siehe Abb. 5.1).

UU2	TRS 3c	25137	AAUUGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25166	I
UU3	TRS 3c	25011	AAUUGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25040	I
UU10	TRS 3c	25164	AAUCGCCA	CUAAAC	GCGG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25193	I
UU11	TRS 3c	25173	AAUCGCCA	CUAAAC	GCGG	UGCGAAA	<b>AUG</b>	25202	I
UU20	TRS 3c	25130	AAUAGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25159	I
UU30	TRS 3c	25120	AAUCGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25149	I
UU31	TRS 3c	25148	AAUCGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25177	I
UU40	TRS 3c	25121	AAUCGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25150	I
UU47	TRS 3c	25133	AAUCGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25162	I
UU54	TRS 3c	25107	AAUCGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25138	I
UU19	TRS 3c	25145	AACUGCCA	CUAAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25174	I
79-1146	TRS 3c	25206	AAUUGCCA	CUAAAU	UCCA	UGCGAAA	<b>AUG</b>	25235	II
79-1683	TRS 3c	25206	AAUUGCCA	CUAAAU	UCCA	UGCGAAA	<b>AUG</b>	25235	II
NTU156	TRS 3c	25206	AACCGCCA	CUAAAU	UCCA	UGCGAAA	<b>AUG</b>	25235	II
UU4	TRS 3c	25153	AAUCGCCA	CUCAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25182	I
UU7	TRS 3c	25158	AAUCGCCA	CUCAAC	GCAA	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25187	I
UU23	TRS 3c	25139	AAUCGCCA	CUCAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25168	I
UU34	TRS 3c	25100	AAUCGCCA	CUCAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25129	I
UCD6	TRS 3c		AAUCGCCA	CUCAAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>		II
UU9	TRS 3c	25135	AAUCGCCA	UUA AAC	GCAG	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25164	I
DF-2	TRS 3c	25226	GAUUUUUC	CUUAGC	AUAC	UUUUGGU	<b>AUG</b>	25255	II
UU15	TRS 3c	25153	AAUCGCCA	AUUAAC	GCAU	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25182	I
UU18	TRS 3c	25138	AAUCGCCA	CUUAAC	GCAU	CGCGAAA	<b>AUG</b>	25235	I
Black	TRS 3bc	24942	CTTTTGAG	GA	GGCTGAACAA	AAAGCTT	<b>AUG</b>	24971	I

**Abb. 5.1: Alignment der TRS-Elemente des Gens 3c von verschiedenen FCoV-Stämmen**

Serotyp I Stämme: UU2 (FJ938060.1), UU3 (FJ938061.1), UU10 (FJ938059.1), UU11 (FJ938052.1), UU20 (HQ392471.1), UU30 (HQ392472.1), UU31 (HQ012371.1), UU40 (HQ392469.1), UU47 (JN183882.1), UU54 (JN183883.1), UU19 (HQ392470.1), UU4 (FJ938054.1), UU7 (FJ938053.1), UU23 (GU553362.1), UU34 (HQ012372.1), UU9 (FJ938062.1), UU15 (FJ938057.1), UU18 (HQ012368.1), Black (EU186072.1); Serotyp II Stämme: UCD6 (FJ943771.1), 79-1146 (AY994055.1), 79-1683 (Y13921.1), NTU156 (GQ152141), DF-2 (DQ286389). Die TRS der verschiedenen Stämme ist farbig hinterlegt (konservierte TRS: lilafarbener Kasten; veränderte TRS wie bei FCoV 79-1146: gelber Kasten; veränderte TRS: blauer Kasten). Die Startcodons für das mRNA-Translationsprodukt 3c sind „Fett“ markiert (**AUG**).

Die meisten der sequenzierten FCoV-Stämme (z.B. UU2) besaßen *upstream* des Gens 3c die konservierte TRS mit dem Motiv 5'-CUAAAC-3'. Einige der Stämme, darunter auch der Serotyp II FIPV Stamm 79-1146, wiesen eine veränderte TRS auf (CUAAAC→CUAAAU). Die veränderte TRS, wie sie bei FCoV 79-1146 zu finden ist, trat auch bei den Stämmen FCoV 79-1683 und NTU156 auf. Bei den Serotyp I Stämmen UU4, UU7, UU23 und UU34 und bei dem Serotyp II Stamm UCD6 trat vermehrt die veränderte TRS CUCAAC auf. Der Stamm UU9 besitzt die veränderte TRS UUA AAC. Bei dem Serotyp I FCoV Laborstamm Black konnte keine TRS

*upstream* des Gens 3c gefunden werden, da dieser Stamm eine 62 nt-lange Deletion in der ORF 3bc Region aufweist, die eine Fusion der beiden ORFs zur Folge hat (Tekes, 2008b).

Haijema et al. (2005) gehen davon aus, dass der Laborstamm 79-1146 wahrscheinlich aus einem Virus entstanden ist, das eine zusätzliche RNA für die Expression des ORF 3c produziert hat. In FIPV 79-1146 ist ORF 3c ein Pseudogen, das durch eine Nonsense-Mutation (Stop Codon) unterbrochen ist (Yamanaka et al., 1998); die TRS weist einen Basenaustausch auf. Interessant wäre es zu überprüfen, ob trotz der veränderten TRS *upstream* des Gens 3c in FIPV 79-1146 eine zusätzliche mRNA produziert und ORF 3c exprimiert wird. Auch bei anderen Alphacoronaviren wie CCoV, TGEV und PRCV befindet sich eine konservierte TRS (CUAAAC) *upstream* des ORF 3c (Horsburgh et al., 1992; Page et al., 1991). Jedoch konnte für CCoV und TGEV keine separate mRNA für das 3c-Gen in Northern Blots detektiert werden (Horsburgh et al., 1992; Rasschaert et al., 1987). Ähnlich wie bei FIPV 79-1146 ist der ORF 3c des CCoV Stamms Insavc-1 durch eine Nonsense-Mutation stark verkürzt (Horsburgh et al., 1992). *In vitro* Transkription und Translation des ORF 3c ergaben mittels SDS-PAGE-Analyse keine erkennbaren Produkte. Um zu überprüfen, ob eine 3c-mRNA in FIPV 79-1146 gebildet wird, könnten in Zukunft Northern Blot Analysen, eine mRNA-Sequenzierung oder eine RT-PCR durchgeführt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante FCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop besitzt ein intaktes 3c-Gen und würde sich für die Untersuchung der Expression des 3c-Proteins eignen.

## 5.2 Serotyp II FCoV 79-1146 als Ausgangsvirus

FIPV 79-1146 ist bis heute das am besten charakterisierte FCoV und wurde ursprünglich von McKeirnan et al. (1981) isoliert. Das Virus ist nahezu genetisch identisch mit FIPV NOR 15, das zur selben Zeit von der gleichen Gruppe aus der Milz von einer an FIP erkrankten Katze isoliert wurde (Evermann et al., 1981). FIPV 79-1146 war auch das erste FCoV, von dem Nukleotidsequenzen zur Verfügung standen (de Groot et al., 1987b; de Groot et al., 1988; Vannema et al., 1991). 2005 veröffentlichten Haijema et al. die komplette Genomsequenz (GenBank: AY994055). Aufgrund mehrerer Vorteile eignete sich der FCoV Stamm 79-1146 hervorragend als Ausgangsvirus für die Versuche in der vorliegenden Arbeit. Neben der bekannten

Genomsequenz ist FIPV 79-1146 hoch virulent und besitzt im Vergleich zum Serotyp I FCoV Stamm Black bessere Wachstumseigenschaften; so wurden *in vitro* z.B. in der Katzenzelllinie FCWF-4 Titer bis zu  $2 \times 10^7$  PFU/ml erreicht. Das Serotyp I FCoV Stamm Black erreichte hingegen nur Titer bis zu  $2 \times 10^4$  PFU/ml. Die Fähigkeit zur Vermehrung in Zellkultur ist Voraussetzung, um rekombinante FCoVs mit dem etablierten revers-genetischen System herstellen und detektieren zu können.

### 5.3 Pathogenese der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP)

Die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP) ist eine spontan auftretende, letal verlaufende systemische Erkrankung für die es noch keine Behandlungsmöglichkeiten gibt. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch das FIP-Virus (FIPV), das nach der weit akzeptierten *internal mutation theory* aus dem Feline Enterale Coronavirus (FECV) durch Mutation in der persistent infizierten Katze entsteht (Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Unser Wissen über die Pathogenese von FIP ist immer noch lückenhaft und basiert hauptsächlich auf Studien mit Feldisolaten. Mit Hilfe des revers-genetischen Systems für feline Coronaviren (Tekes et al., 2008a) wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein rekombinantes FCoV Stamm 79-1146 hergestellt, dessen Wachstumseigenschaften *in vitro* mit den des Ausgangsvirus FCoV 79-1146 nahezu identisch sind und das FIP in Katzen induzieren kann. Dadurch wurde ein neues System für die Analyse der Pathogenese von FIP etabliert, das bedeutende Vorteile besitzt. Das gesamte FCoV-Genom ist zugänglich für die Mutagenese und die komplette Genomsequenz ist bekannt, da das verwendete rekombinante FCoV von einer klonierten genomlangen cDNA generiert wurde. Dieser Vorteil wurde genutzt, als wir das FCoV-Genom aus den an FIP erkrankten Katzen re-sequenziert haben. Verglichen mit der klonierten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Genomsequenz wurden zwei Nukleotidunterschiede, die zu Aminosäureaustauschen führten, in dem viralen Genom, das aus der Milz isoliert wurde, festgestellt. Eine Mutation wurde im S-Gen an Position nt 22468 des rekombinanten FCoV 79-1146 Genoms detektiert. Interessant war, dass in der viralen RNA aus der Niere zusätzlich zu der Mutation an Position nt 22468 zwei weitere Nukleotidaustausche im S-Gen detektiert wurden. Dies führte zu der Annahme, dass sich das in der Niere replizierende Virus weiter verändert hat und aus dem Virus, das in der Milz replizierte, entstand. Das S-Protein stellt in Coronaviren das dominante virale Antigen

dar und induziert eine adaptive Immunantwort (Cavanagh, 1995). Veränderungen im S-Gen könnten zu Virus-Varianten führen, die dem Immunsystem entkommen. Zudem wurden Mutationen im S-Gen mit dem FIP-Phänotyp in Zusammenhang gebracht (Rottier et al., 2005; Chang et al., 2012; Terada et al., 2012). Chang et al. (2012) schlugen vor, dass Veränderungen im S-Gen von FECV zu einem Tropismuswechsel führen, der es dem Virus ermöglicht, vom Darm ins Körpergewebe zu gelangen und anschließend FIP zu verursachen. Von 11 sequenzierten Genomen von jedem Biotyp wurde in neun FIPV an Position 1058 nt des S-Gens die Aminosäure Methionin gegen Leucin ausgetauscht. Terada et al. (2012) fanden heraus, dass die 5'-terminale Region des S-Gens nicht essenziell für die Entwicklung von FIP ist. Der FIPV-Stamm C3663 löste trotz einer Deletion von 245 Aminosäuren in der N-terminalen Region des S-Proteins bei zwei von vier Katzen die Krankheit FIP aus; eine dritte Katze zeigte 91 Tage nach Infektion mit diesem Stamm klinische Anzeichen für FIP (Terada et al., 2012).

Das verblüffendste Ergebnis unserer Infektionsstudien war die Wiederherstellung des ORF 3c in den Viren aus den an FIP erkrankten Katzen. Aufgrund der Nukleotidveränderung an Position nt 25353 im FCoV-Genom wurde nun anstelle eines Stopcodons die Aminosäure Glutamin kodiert. Im Hinblick auf die Entstehung von FIPV liegt die größte Aufmerksamkeit auf dem 3c-Gen. Zwei Studien zeigten kürzlich, dass der Großteil der FIPVs ein mutiertes 3c-Gen aufweisen (Pedersen et al., 2009; Chang et al., 2010). Hingegen besitzt die Mehrheit der FECVs ein intaktes 3c-Gen. Das führte zu der Annahme, dass ein funktionsfähiges 3c-Protein entscheidend für die FECV-Replikation im Darm, aber unwesentlich für die systemische FIPV-Replikation ist (Chang et al., 2010). Unsere Beobachtung, dass ORF 3c in den Serotyp II FCoVs rek 79-1146 und 79-1146 aus den an FIP erkrankten Katzen wiederhergestellt wurde, deuten auf eine starke Selektion für ein funktionelles 3c-Protein während der Serotyp II FCoV 79-1146 Replikation *in vivo* hin. Zudem ist anzumerken, dass in den vorherigen Studien FIPV-Isolate sequenziert wurden, die natürlich während einer FCoV-Infektion aus FECV entstanden sind. Dies beinhaltet die primäre Replikation von FECV im Darm, bevor pathogene FIPV-Varianten, die oft Mutationen im 3c-Gen besitzen, entstehen (Tekes und Spies et al., 2012).

Laut der durchgeführten Studien scheinen Veränderungen im S- und im 3c-Gen mit der FCoV-Virulenz im Zusammenhang zu stehen. *In vivo* Infektion mit einem rekombinanten FCoV, das den genetischen Hintergrund des apathogenen Serotyp I

FCoV Stamm Black und die Gene S und 3abc von dem virulenten Serotyp II FCoV 79-1146 enthielt, induzierte überraschend keine FIP (Tekes und Spies et al., 2012). Um die Auswirkungen der detektierten Mutationen im S-Gen an Position nt 22468 und im 3c-Gen an Position nt 25353 einzeln und in Kombination untersuchen zu können, wurden mit Hilfe des revers-genetischen Systems erfolgreich rekombinante FCoVs hergestellt, die die detektierten Nukleotidveränderungen jeweils einzeln und in Kombination enthielten. Verglichen mit dem rekombinanten Ausgangsvirus rekFCoV 79-1146 und mit dem WT-Virus FCoV 79-1146 erreichten diese Viren in Zellkultur niedrigere Titer. Dieser phänotypische Unterschied ist vermutlich auf die eingeführten Nukleotidveränderungen zurückzuführen. Die Bestimmung der Virulenz dieser Viren erfordert die Infektion von Katzen.

#### 5.4 Coronaviren als Vektoren

Auf Grundlage der erfolgreichen Entwicklung von effizienten revers-genetischen Systemen für Coronaviren konnte das Potenzial dieser Viren als Vektor für die heterologe Genexpression studiert und bestätigt werden. Coronaviren stellen erfolgsversprechende Virus-Vektoren für die Impfstoffherstellung und für die Gentherapie dar (Enjuanes et al., 2001). Für die Untersuchung der coronaviralen Treffzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein rekombinantes FCoV hergestellt, das das Reportergen GFP anstelle der Gene 3abc heterolog exprimiert. Die effiziente Replikation des transkribierten GFP-exprimierenden rekombinanten FCoV in Zellkultur auf feline Zellen sowie die stabile GFP-Expression über mehrere Passagen demonstrieren die Möglichkeit, FCoV als Vektor für die heterologe Genexpression zu verwenden. Unsere Daten unterstützen die publizierten Studien, wonach die akzessorischen Proteine für die *in vitro* Replikation von CoV nicht essenziell sind (Ontiveros et al., 2001; de Haan et al., 2002; Haijema et al., 2003; Marra et al., 2003; Ortego et al., 2003; Snijder et al., 2003; Haijema et al., 2004; Casais et al., 2005; Yount et al., 2005; Cavanagh et al., 2007). Für die *in vivo* Virulenz spielen sie hingegen eine wichtige Rolle. Deletionen der gruppenspezifischen Gene 3abc oder 7ab führten in der Katze zu einem attenuierten Phänotyp; die infizierten Katzen zeigten keine klinischen Symptome (Haijema et al., 2004). Veränderungen in den akzessorischen Genen, besonders in dem 3c-Gen, wurden mit der Virulenz von FCoV in Zusammenhang gebracht (Vennema et al.,

1998; Kennedy et al., 2001; Rottier et al., 2005; Kennedy et al., 2008; Pedersen et al., 2009; Chang et al., 2010). Es konnte bereits ein weiteres rekombinantes GFP-exprimierendes Serotyp II FCoV hergestellt werden, bei dem die akzessorischen Gene 3abc nicht ersetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Das Reportergen GFP wurde zusammen mit einer TRS in das coronavirale Genom eingeführt und bildete einen komplett neuen ORF zwischen dem FCoV ORF 2 und ORF 3. Die Insertion war über mehrere Passagen stabil und das rekombinante Virus zeigte ein effizientes Wachstum auf feline Zelllinien. Die Virulenz müsste in Infektionsversuchen mit Katzen überprüft werden.

Eine stabile GFP-Expression über mehrere Passagen konnte bereits für mehrere Coronaviren gezeigt werden. Curtis et al. (2002) und Sola et al. (2003) konstruierten ein rekombinantes TGEV, das anstelle des ORF 3a das GFP-Gen stabil exprimiert. Eine stabile und effiziente GFP-Expression und *in vitro* Replikation zeigte auch das rekombinante MHV, das das Reportergen anstelle des Gens 4 exprimiert (Fischer et al., 1997; Sarma et al., 2004). 2008 wurde bereits ein GFP-exprimierendes rekombinantes Serotyp I FCoV hergestellt, dessen ORF 3 durch das Reportergen stabil ersetzt wurde und ein effizientes Wachstum *in vitro* aufwies (Tekes et al., 2008a). 2005 konnten de Haan et al. zeigen, dass eine stabilere Expression von Fremdgenen erreicht wurde, wenn sie nicht-essenzielle coronavirale Gene ersetzen. Die genetische Stabilität eines viralen Vektors ist essenziell für die erfolgreiche Entwicklung eines Impfstoffes auf Basis eines Vektors. Wurde das GFP-Gen als Verlängerung des S-Gens in das MHV-Genom eingefügt, ging das genetische Material des Reportergens GFP vollständig verloren (Bosch et al., 2004). Eine Insertion des GFP-Gens in das MHV-Genom *downstream* des N-Gens resultierte in nicht-lebensfähigen Viren (Hsue und Masters, 1999) und in das TGEV-Genom in einer sehr instabilen Expression (Sola et al., 2003).

Um FCoV als Vektor für die Impfstoffherstellung zu nutzen, wurden zudem im Rahmen dieser Arbeit rekombinante Serotyp I FCoVs konstruiert, die die caliciviralen Strukturproteingene (ORF 2 und ORF 3) heterolog exprimieren. Wir haben uns für das rekombinante Serotyp I FCoV Stamm Black als Vektor für die heterologe Genexpression entschieden, da das Virus zum einen die Reportergene GFP und RL bereits stabil anstelle des ORF 3 exprimiert hat (Tekes et al., 2008a) und es sich zum anderen hierbei um ein apathogenes Virus handelt, das seine Virulenz wahrscheinlich durch Zellkulturadaption verloren hat. Um als Vektor für die

Impfstoffherstellung zu fungieren, ist dies eine entscheidene Eigenschaft. Bereits nach der ersten Passage war die Expression der FCV-Strukturproteingene (ORFs 2 und 3) sowohl anstelle des ORF 3 als auch des ORF 7 des coronaviralen Genoms instabil. Große Teile der caliciviralen Gene wurden deletiert. Feline Caliciviren (FCVs) sind bedeutende Erreger von Erkrankungen des oberen Respirationstraktes bei der Katze. In den vergangenen Jahren gab es jedoch vermehrt Berichte über Ausbrüche durch hypervirulente Stämme von FCV, die eine schwerwiegende fieberhafte, hämorrhagische Erkrankung in Katzen mit hoher Mortalität verursachen (Hurley und Sykes, 2003; Hurley et al., 2004; McCabe und Spibey, 2005). Impfstoffe gegen feline Caliciviren, die auf attenuierten Lebend- oder inaktivierten Impfstoffen basieren, sind verfügbar. Jedoch bestehen Bedenken, dass die antigenetische Variation zu neuen Feldstämmen führt, gegen die die Impfstoffe keinen Schutz bieten (McCabe und Spibey, 2005). Das Kapsidprotein (ORF 2) von feline Caliciviren assembliert in kultivierten Katzenzellen zu Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLP) (Geissler et al., 1999) und induziert aufgrund der viralen Oberflächenproteine eine Immunantwort (McCabe et al., 2002). VLPs eignen sich besonders als Impfstoffe. Da anzunehmen ist, dass das ORF 3 kodierte Protein beim Zusammenbau dieser VLPs involviert ist (Geissler et al., 1999), wurde ORF 2 zusammen mit ORF 3 von FCV in das coronavirale Genom eingefügt. Analysen bei anderen Caliciviren zeigten allerdings, dass das ORF 3 Protein für den Kapsidzusammenbau nicht von Bedeutung ist (Williams et al., 1997). Es wurden weitere rekombinante FCoV hergestellt, dessen ORF 3 bzw. ORF 7 nur durch den caliciviralen ORF 2 ersetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Auch hier war die Insertion an beiden Positionen im coronaviralen Genom bereits nach der ersten Passage instabil und große Teile der caliciviralen Kapsidgenesequenz wurden deletiert. De Haan et al. (2003 und 2005) konnten zeigen, dass die Stabilität der heterologen Genexpression sowohl von der Position im Genom als auch vom Fremdgen und vom coronaviralen Hintergrund abhängig ist. Auch Sola et al. (2003) demonstrierten, dass die Insertion einer Expressionskassette im 3'-Bereich des TGEV-Genoms zwischen den Genen N und 7 zu einem instabilen rekombinanten Virus führte, dessen eingeführte heterologe Gene (GFP bzw.  $\beta$ -Glucuronidase) zusammen mit der TRS komplett deletiert wurden. Desweiteren führte die Insertion von heterologen Sequenzen zwischen dem N-Gen und der 3'-UTR in MHV zu genomischer Instabilität (Hsue und Masters, 1999). Die Instabilität von Fremdgenen, die am 3'-Ende des



Genoms eingefügt wurden, scheint ein generelles Phänomen zu sein. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass der Austausch des coronaviralen ORF 7 durch die caliciviralen Gene zu instabilen Viren führte. Es ist jedoch erstaunlich, dass das Kapsidproteingen von FCV nicht erfolgreich anstelle des ORF 3 des rekombinanten Serotyp I FCoV Stamm Black exprimiert werden konnte. Die Erhaltung des eingeführten Fremdgens ist offenbar abhängig von der viralen Mutations- und Rekombinationsrate. Größere Gene scheinen weniger stabil und anfälliger für Deletionen zu sein. Das Fremdgen könnte Sequenzen enthalten, die mehr empfänglich für Mutationen oder Rekombinationen während der coronaviralen Replikation sind (de Haan et al., 2005). Auch RNA-Sekundärstrukturen begünstigen Rekombinationen, die offensichtlich häufig zu Deletionen führen. Punktmutationen wurden oft beobachtet, wenn heterologe Gene in Negativstrang-RNA-Viren eingefügt wurden (Dalton und Rose, 2001; Wertz et al., 2002). Verglichen mit Positivstrang-RNA-Viren treten bei Minusstrang-RNA-Viren vermindert Rekombinationen auf (Figlerowicz et al., 2003). Zudem zeigen DNA-Viren im Vergleich zu RNA-Viren eine hohe Stabilität der Fremdgenexpression (de Haan et al., 2005). Erfolgreich heterolog exprimiert wurde das feline calicivirale Kapsidproteingen von einem rekombinanten Myxoma-Virus. Das rekombinante Virus löste in der Katze eine schützende Immunantwort gegen virulente feline Caliciviren aus (McCabe et al., 2002). Nach den ersten beiden Impfungen konnten mit diesem Vektor bereits neutralisierende Titer von 1:3000 erreicht werden. Etablierte FCV-Impfstoffe führten nach zwei Impfungen zu einem Titer von 1:640.

## 5.5 Treffzellen für feline Coronaviren

Während FIPVs einen primären Tropismus für Monozyten/Makrophagen aufweisen und sich so systemisch im Körper ausbreiten können (Pedersen, 1976; Weiss und Scott, 1981), findet die Replikation von FECVs hauptsächlich lokal in Epithelzellen des Intestinaltraktes statt (Pedersen et al., 1981; Pedersen et al., 1984). FECVs können auch Monozyten/Makrophagen infizieren, jedoch replizieren sie nur schwach in diesen, erreichen niedrige Titer und breiten sich nicht effizient auf weitere Monozyten/Makrophagen aus (Stoddart und Scott, 1989; Dewerchin et al., 2005). Untersuchungen zeigten, dass die Effizienz der Replikation von FCoVs in Monozyten/Makrophagen mit der Virulenz des Virus korreliert (Stoddart und Scott,

1989; Dewerchin et al., 2005; Rottier et al., 2005). Im Hinblick auf die Schlüsselrolle von Monozyten/Makrophagen in der Pathogenese von FIP wurden 2008 von Tekes et al. ein GFP-exprimierendes rekombinantes Serotyp I FIPV Stamm Black konstruiert und die vermeintlichen FIPV-Treffzellen Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) infiziert (Tekes et al., 2008a). Die Analysen ergaben, dass eine effiziente Replikation nur in sehr wenigen Monozyten, Makrophagen und DCs zu beobachten war. Aufgrund dieser überraschenden Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit das kürzlich hergestellte GFP-exprimierende rekombinante Serotyp II FIPV 79-1146 für ergänzende Untersuchungen der feline coronaviralen Treffzellen verwendet. Verglichen mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten FCoV Serotyp I Black ließen sich wenige CD14-positive Zellen und kaum PBMC mit dem Serotyp II GFP-Virus infizieren. Keine GFP-Expression konnte in den Zellen nach Inkubation mit dem Serotyp I GFP-Virus detektiert werden. Ein großer Unterschied zwischen den beiden rekombinanten GFP-Viren Serotyp I und II konnte auch in Zellkultur beobachtet werden. Das rekombinante Serotyp II GFP-Virus 79-1146 replizierte in der Katzenzelllinie FCWF-4 viel schneller, erreichte deutlich höhere Titer und bildete größere Plaques als das rekombinante Serotyp I GFP-Virus Black. Die Wachstums- und Plaquegrößenunterschiede wurden auch bei den FCoV Wildtyp-Stämmen 79-1146 und Black in der Katzenzelllinie FCWF-4 gezeigt (Tekes et al., 2010). Die Infektion der feline CrFK-Zelllinie war mit FCoV 79-1146 auch effizienter als mit FCoV Black (van Hamme et al., 2007). Der bestimmende Faktor für die Zielzellspezifität und für den Zelleintritt ist das coronavirale S-Protein. Für Serotyp II FCoVs ist der zelluläre Rezeptor die feline Aminopeptidase N (fAPN oder CD13) (Tresnan et al., 1996; Dye et al., 2007; Haijema et al., 2007; Wentworth und Holmes, 2007). Hohdatsu et al. (1998) und Tekes et al. (2010) konnten in Inhibitionsstudien zeigen, dass der monoklonale Antikörper R-G-4, der die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren von fAPN erkennt, die Infektion von FCWF-4-Zellen mit Serotyp II FCoVs komplett blockierte, jedoch nicht die Infektion mit Serotyp I FCoVs. Diese Untersuchungen bestätigten, dass Serotyp I und Serotyp II FCoVs unterschiedliche zelluläre Rezeptoren verwenden und lieferten Erklärungen für die bessere Vermehrung von Serotyp II FCoVs in Zellkultur in FCWF-4- und CrFK-Zellen. Tekes et al. (2010) konnten zudem zeigen, dass das rekombinante Serotyp I FCoV Stamm Black, das das Typ II FCoV 79-1146 S-Protein exprimiert, sich in Zellkultur auf FCWF-4-Zellen phänotypisch wie das Serotyp II FCoV 79-1146 verhielt. Somit ist das

S-Protein nicht nur für die effiziente Verwendung des zellulären Rezeptors verantwortlich, sondern auch für die Wachstumskinetik in Zellkultur. Die Verwendung von unterschiedlichen Rezeptoren ist wahrscheinlich auf die Entstehung von Serotyp II FCoV durch homologe Rekombination zwischen Serotyp I und caninem Coronavirus (CCoV) zurückzuführen. Das S-Gen und flankierende Bereiche des Serotyp I FCoV wurden durch die korrespondierenden Sequenzen des CCoV-Genoms ersetzt. Daher ist die Sequenzhomologie in den N-terminalen 700 Aminosäuren des S-Proteins, die für die Rezeptorbindung wichtig sind, zwischen beiden Serotypen sehr gering (Hohdatsu et al., 1998). Die Aminopeptidase N agiert für einige Mitglieder der Alphacornaviren als zellulärer Rezeptor. So verwenden HCoV 229E die humane APN (hAPN) (Yeager et al., 1992; Hofmann et al., 2005), PRCoV und PEDV die porcine APN (pAPN) (Delmas et al., 1993; Li et al., 2007) und TGEV sowohl die porcine als auch die feline APN (fAPN) (Delmas et al., 1992; Tresnan et al., 1996). Der zelluläre Rezeptor für Serotyp I FCoVs wurde noch nicht identifiziert. Einige Coronaviren verwenden eine Anzahl an Co-Rezeptoren, wie z.B. Sialinsäure und C-Typ Lektin, während ihres Zelleintritts (Wentworth und Holmes, 2007). *Liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin* (L-SIGN oder CD209L) vereinfacht die Infektion von SARS-CoV und HCoV-229E (Jeffers et al., 2004; Jeffers et al., 2006). Regan und Whittaker (2008) zeigten, dass Typ I und Typ II FCoVs *feline dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin* (fDC-SIGN) als Co-Rezeptor verwenden können. Sehr interessante Ergebnisse ergaben Untersuchungen mit der humanen Huh7-Zelllinie; ein sehr hoher Prozentsatz der Huh7-Zellen ließ sich mit dem rekombinanten Serotyp I GFP-Virus infizieren (Bank-Wolf und Thiel, unveröffentlichte Daten). Dagegen war nur ein sehr geringer Prozentsatz der Huh7-Zellen für eine Infektion mit dem Serotyp II GFP-Virus empfänglich. Welche(r) Rezeptor/Rezeptoren von Serotyp I FCoVs verwendet wird/werden ist noch nicht gänzlich geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass der verwendete Rezeptor für den Wirtszelleintritt von Serotyp I FCoVs nicht auf feline Zellen beschränkt ist (Bank-Wolf und Thiel, unveröffentlichte Daten).

Interessant ist, dass beide Serotypen unterschiedliche Rezeptoren verwenden und trotzdem die gleiche Krankheit auslösen können. Unsere Analysen hinsichtlich der Infektion von FCoV-Treffzellen mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp I FCoV Stamm Black unterstützen die Studie von Tekes et al. (2008a). Hier müsste zunächst abgeklärt werden, ob die uneffiziente *in vitro* Infektion von PBMC,

Monozyten und Makrophagen mit dem FIPV Stamm Black zusammenhängt, da dieser *in vivo* bereits kein FIP mehr induzieren konnte. Oder die Avirulenz ist in der Zellkultur unerheblich und Serotyp I FIPVs können die Treffzellen, ähnlich wie die felines Zelllinien, nicht so effizient wie Serotyp II FIPVs infizieren. Eine größere Überraschung war, dass auch nur ein geringer Prozentsatz von frisch isolierten PBMC und CD14-positiven Zellen empfänglich für das GFP-exprimierende rekombinante Serotyp II FIPV 79-1146 war. Dewerchin et al. (2005) zeigten bereits, dass sich weniger als 1% der Monozyten mit dem FCoV Serotyp II 79-1146 infizieren ließen. Allgemein bleibt zu klären, ob ein verstärkter Monozyten/Makrophagentropismus von beiden Serotypen mit der Virulenz *in vivo* und der Replikation *in vitro* korreliert. Rottier et al. (2005) stellten fest, dass das S-Protein der entscheidende Faktor für eine effiziente Infektion von Makrophagen ist. Die Anhaftung an den zellulären Rezeptor wird durch die N-terminale Domäne und die Fusion der viralen Hülle mit der Wirtszellmembran durch die C-terminale Domäne des S-Proteins vermittelt (Cavanagh, 1995; Bosch et al., 2003). Interessanterweise ist nach Rottier et al. (2005) für den Makrophagentropismus die C-terminale Domäne verantwortlich, was eine Korrelation zwischen der Fusionsaktivität und dem Zelltropismus vermuten lässt (Rottier et al., 2005). Unsere Analysen der fAPN-Expression in frisch isolierten felines Leukozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie ließen erkennen, dass nur eine sehr geringe Anzahl an Monozyten, keine T-Lymphozyten und vermehrt B-Lymphozyten fAPN exprimierten. Zuvor berichteten Takano et al. (2007) von einer ähnlich geringen Anzahl an Monozyten, die fAPN exprimieren. Eine Hochregulierung der fAPN-Expression wurde erreicht, indem die Makrophagen mit dem Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) inkubiert wurden. Vermutlich stieg die Empfänglichkeit der felines Makrophagen für eine FCoV-Infektion durch die Entzündungsbedingungen an. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Empfänglichkeit von felines Monozyten/Makrophagen für eine Infektion mit Serotyp II FIPV 79-1146 vom genetischen Hintergrund des Wirts abhängig ist (Dewerchin et al., 2005; van Hamme et al., 2007). Die Expression von fAPN in B-Lymphozyten war sehr überraschend, da Lymphozyten und von ihnen abgeleitete Zelllinien als CD13-negativ gelten (Look et al., 1989; Ashmun und Look, 1990; Shipp und Look, 1993; Huschak et al., 2003). APN konnte vereinzelt bei malignen Lymphozyten nachgewiesen werden (Look et al., 1989; Ashmun und Look, 1990). Ansonsten wird APN auf der Zelloberfläche von Epithelzellen der Niere, des Darms und des

Respirationstraktes sowie in Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, cerebralen Perizyten an der Blut-Hirn-Schranke und in synaptischen Membranen des zentralen Nervensystems exprimiert (Kenny und Maroux, 1982; Look et al., 1989; Hohdatsu et al., 1998). Ob B-Lymphozyten mögliche Treffzellen für FCoV darstellen, ist abzuklären.

In einem weiteren *in vitro* Infektionsversuch konnte eine erhöhte Empfänglichkeit der feline Monozyten/Makrophagen und CD14-positiven Zellen für die Infektion mit dem GFP-exprimierenden rekombinanten Serotyp II FCoV 79-1146 festgestellt werden, wenn die Zellen sich bereits eine Woche vor der Infektion in Kultur befanden. Verglichen mit den CD14-positiven Zellen waren die Effizienz der Virus-Replikation, die Virustiter und der Prozentsatz infizierbarer Zellen bei den Monozyten/Makrophagen deutlich höher. 16,4% der CD14-positiven Zellen, die eine Woche in Kultur waren, wurden 72 h p.i. infiziert und zeigten GFP-Expression. Bei den Monozyten/Makrophagen waren es durchschnittlich 58,4%. Die CD14-positive Zellpopulation bestand aus B-Lymphozyten und aus Monozyten/Makrophagen, da das Oberflächenprotein CD14, das hauptsächlich auf der Oberfläche von Monozyten/Makrophagen zu finden ist (Simmons et al., 1989), laut unseren FACS-Analysen auch in B220-positiven B-Zellen exprimiert wurde. Schuhmann et al. (1994) gaben ebenfalls Hinweise, dass B-Zellen positiv für CD14 sind. Die B-Zellpopulation lag *in vitro* größtenteils in Suspension vor und besaß im Durchschnitt eine maximale Lebensdauer von 3-4 Tagen. Medienwechsel und die kurze Lebensdauer verringerten stark die zu infizierenden Zellen. Nach sieben Tagen in Kultur lagen meistens nur noch die adhärenenten Monozyten/Makrophagen aus der CD14-positiven Zellpopulation vor. Somit sind der Anstieg des Virustiters sowie die Zunahme an infizierbaren Zellen auf die effiziente Replikation in den Monozyten/Makrophagen zurückzuführen. Monozyten/Makrophagen machen aber nur höchstens 5% der PBMC aus. Das sind mögliche Erklärungen dafür, dass bei den CD14-positiven Zellen aufgrund der wenigen Monozyten/Makrophagen maximal 16,4% infizierte Zellen vorlagen. Unsere Daten unterstützen die bisherigen Aussagen, dass die Monozyten/Makrophagen die Treffzellen von feline Coronaviren sind. Eine Infektion von frisch isolierten bzw. drei Tage alten CD14-positiven Zellen, die eine Mehrzahl an B-Lymphozyten enthielten, war sehr uneffizient und eine Replikation kaum zu beobachten. Auch zeigten die frisch isolierten PBMC aus dem ersten Infektionsversuch kaum eine GFP-Expression. Eine verstärkte Empfänglichkeit der

Monozyten/Makrophagen-Population für die Infektion mit dem rekombinanten Serotyp II GFP-Virus lag vermutlich daran, dass die frisch isolierten Monozyten innerhalb der sieben Tage zu Makrophagen differenzierten. Eine Differenzierung konnte ohne Stimulation mit Zytokinen *in vitro* beobachtet werden. Eine Behandlung mit *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) führte nicht zu einem höheren Prozentsatz infizierbarer Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei mehreren Viren konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Makrophagen-Differenzierung positiv auf die Replikation in Monozyten/Makrophagen auswirkt (Gendelman und Morahan, 1992). Zudem könnten Veränderungen in der CD13-Expression in den Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen aufgetreten sein. Huschak et al., (2003) berichteten, dass die CD13-Expression durch das Zellwachstum und die Differenzierung beeinflusst wird. Die Expression von CD13 steigt während der Reifung von Makrophagen. Bukowska (2002) gab Hinweise, dass die CD13-Expression auf Vorläuferzellen der lymphozytären als auch der myelo-monozytären Zellen nachgewiesen wurde. Im Verlauf der weiteren Zelldifferenzierung konnte eine CD13-Immunreaktivität nicht beobachtet werden, die aber ab einem späteren Differenzierungsstadium auf Zellen der myelo-monozytären Linie wieder ausgebildet wurde. Wie oben erwähnt, ergaben unsere FACS-Analysen, dass der Rezeptor fAPN nur gering in frisch isolierten Monozyten exprimiert wurde. In weiteren Versuchen müsste abgeklärt werden, ob die Expression des Rezeptors in Monozyten zunimmt, wenn sie 3-7 Tage in Kultur waren; dies würde eine Erklärung für die erhöhte Empfänglichkeit dieser Zellen für die Infektion nach sieben Tagen in Kultur erklären. Die Infektion wirkt vermutlich zudem stimulierend auf die Makrophagen und die CD13-Expression, da der maximale Prozentsatz infizierter Monozyten/Makrophagen und die effizienteste Replikation 72 h p.i. zu beobachten war. In Studien mit dem Porzinen Respirations- und Respirations-Syndrom Virus (PRRSV) aus der Familie *Arteriviridae* haben Duan et al. (1997) beschrieben, dass das Differenzierungsstadium und die Aktivierung der Monozyten/Makrophagen die Empfänglichkeit für eine PRRSV-Infektion beeinflussen. PRRSV besitzt einen eingeschränkten Tropismus für eine Subpopulation von porzinen Monozyten/Makrophagen. Frisch isolierte peritoneale Makrophagen und periphere Monozyten waren für eine PRRSV-Infektion nicht empfänglich, wohl aber alveolare Makrophagen. Wurden die Zellen 24 h nach ihrer Kultivierung infiziert, waren einige periphere Monozyten für die Infektion empfänglich, während die peritonealen Makrophagen unempfindlich

blieben. Bei den alveolaren Makrophagen, die 24 h nach der Kultivierung infiziert wurden, nahmen die Virustiter und der Prozentsatz infizierbarer Zellen signifikant zu. Auf Grundlage unserer Ergebnisse wäre es interessant, die Empfänglichkeit von Monozyten/Makrophagen, die sieben Tage in Kultur waren, für die Infektion mit dem rekombinanten Serotyp I GFP-Virus Stamm Black zu untersuchen und mit dem rekombinanten Serotyp II GFP-Virus zu vergleichen. Zudem wäre es denkbar, verschiedene feline Monozyten/Makrophagen-Subpopulationen zu präparieren, und die Replikation nach Infektion mit beiden Serotypen von FCoV zu vergleichen. Desweiteren bleibt zu klären, inwieweit die *in vitro* Versuche den Verhältnissen *in vivo* entsprechen. Die Analyse der Treffzellen von feline Coronaviren stellt einen interessanten Aspekt in der Aufklärung der Pathogenese von FIP dar.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere rekombinante FCoV-Stämme unter Verwendung eines im Labor vorhandenen revers-genetischen Systems für Serotyp I feline Coronaviren hergestellt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

1. Für die Herstellung eines rekombinanten Serotyp II FCoV-Stamm 79-1146 wurden die Serotyp I FCoV-Sequenzen der 5'-UTR, der Gene 1ab (N-terminaler Bereich, nt 1-13750), E, M, N, 7ab und der 3' UTR in dem chimären Virus rekFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc durch die korrespondierenden Serotyp II FCoV-Sequenzen ausgetauscht. Der Austausch erfolgte in mehreren Schritten mit Hilfe der Vaccinia Virus vermittelten homologen Rekombination. Im Vergleich mit dem Ausgangsvirus FCoV 79-1146 wurde das rekombinante FCoV 79-1146 hinsichtlich Wachstumskinetik und Plaquemorphologie charakterisiert. Das rekombinante FCoV 79-1146 unterschied sich phänotypisch nicht vom Ausgangsvirus.
2. In einem Infektionsversuch mit Katzen wurde die Virulenz von FCoV 79-1146 und dem generierten rekFCoV 79-1146 bestätigt. Das FCoV-Genom aus den an FIP erkrankten Katzen wurde re-sequenziert und mit der klonierten Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 Genomsequenz verglichen. Interessante Mutationen wurden im S-Gen und dem 3c-Gen gefunden. Im Anschluss wurden rekombinante FCOVs hergestellt, die diese Mutationen einzeln und in Kombination aufwiesen.
3. In nachfolgenden Versuchen wurden rekombinante feline Coronaviren als Vektoren für die heterologe Genexpression eingesetzt. Das rekombinante Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 wurde als Vektor für die Expression des grün fluoreszierenden Reportergens GFP verwendet. Mit dem revers-genetischen System wurden die Gene 3abc durch das Reportergen ersetzt. Die stabile Expression von GFP konnte über mehrere Passagen in der Zellkultur nachgewiesen werden. Das hergestellte GFP-exprimierende Serotyp II FCoV 79-1146 wurde im Vergleich mit dem GFP-exprimierenden Serotyp I FCoV Black charakterisiert. In Bezug auf die Wachstumskinetik und auf die Plaquemorphologie unterschieden sich die GFP-Viren signifikant voneinander. Das Serotyp II GFP-Virus replizierte schneller, erreichte höhere Titer und bildete größere Plaques als das Serotyp I GFP-Virus.



Für die Expression der feline calicivirale Strukturproteingene (ORF 2 und ORF 3) diente das rekombinante FCoV Stamm Black als Vektor. Es wurde ein rekombinantes FCoV-Virus hergestellt, das die heterologen Gene anstelle der Gene 3abc besaß und ein rekombinantes Virus, dessen Gene 7ab ersetzt wurden. An beiden Positionen fand keine stabile Expression statt.

4. Abschließend wurden Infektionsstudien zum Nachweis der Treffzellen von feline Coronaviren durchgeführt. Zunächst erfolgten die Inkubation von frisch isolierten PBMC und CD14-positiven Zellen aus SPF-Katzen mit den GFP-exprimierenden FCoVs Serotyp I und II infiziert und die Überprüfung der GFP-Expression in den Zellen. Während bei den Zellen nach Inkubation mit dem Serotyp I GFP-Virus keine GFP-Expression zu beobachten war, konnte bei wenigen CD14-positiven Zellen und bei sehr wenigen PBMC eine GFP-Expression nach Inkubation mit dem Serotyp II GFP-Virus detektiert werden. In einem weiteren Versuch wurden Monozyten/Makrophagen und CD14-positive Zellen, die aus dem Blut von FCoV-seropositiven Katzen isoliert wurden, zu unterschiedlichen Zeiten (24 h, 72 h, 168 h) nach ihrer Kultivierung mit dem Serotyp II GFP-Virus infiziert. Die Virustiter und der Prozentsatz infizierbarer Zellen nahmen zu, wenn sich die Zellen vor der Infektion über mehrere Tage in Kultur befanden. 168 h nach Isolierung bestanden die CD14-positiven Zellen hauptsächlich nur noch aus Makrophagen. Der Anstieg der Virustiter sowie die Zunahme an infizierbaren Zellen waren somit auf die effiziente Replikation in einer definierten Zellpopulation, den Monozyten/Makrophagen, zurückzuführen. FACS-Analysen ergaben, dass die CD13/fAPN-Expression in frisch isolierten Monozyten sehr gering ist.

## 7. Summary

In this study different recombinant FCoV strains were generated using a reverse genetic approach for serotype I feline coronaviruses which is available in our lab. The results are demonstrated in the following:

1. For the generation of a recombinant serotype II FCoV-strain 79-1146 serotype I FCoV sequences of the 5'-UTR, the genes 1ab (N-terminal area, nt 1-13750), E, M, N, 7ab and the 3'-UTR of the chimeric virus recFCoV  $\Delta$ 1b, S, 3abc were replaced in several steps by the corresponding serotype II FCoV sequences. The replacement occurred by vaccinia virus mediated homologous recombination. In comparison with the wildtype virus FCoV 79-1146 the recombinant FCoV 79-1146 was characterized with regard to growth kinetics and plaque morphology. The recombinant FCoV 79-1146 did not differ phenotypically from the wildtype virus.
2. In an infection study with cats the virulence of FCoV 79-1146 and the generated rekFCoV 79-1146 was confirmed. The FCoV genome from the FIP-diseased cats was re-sequenced and compared to the cloned serotype II FCoV strain 79-1146 genomic sequence. Interesting mutations were found in the S gene and in the 3c gene. Subsequent recombinant FCoVs were generated, which exhibited these mutations separately as well as in combination.
3. In subsequent experiments recombinant feline coronaviruses were used as vectors for the heterologous gene expression. The recombinant serotype II FCoV strain 79-1146 was utilized as vector for the expression of the green fluorescent reporter gene GFP. Using the reverse genetic system the genes 3abc were replaced by the reporter gene. The stable expression of GFP was demonstrated for several passages in cell culture. The generated GFP-expressing serotype II FCoV 79-1146 was characterized in comparison with the GFP-expressing serotype I FCoV Black. In reference to growth kinetics and plaque morphology the recombinant GFP viruses differed significantly from each other. The serotype II GFP virus replicated faster, reached higher titers and formed larger plaques than the serotype I GFP virus.  
For the expression of the feline caliciviral structural genes (ORF 2 and ORF 3) the recombinant FCoV strain Black served as vector. Two recombinant viruses

were generated: a virus which had the heterologous genes instead of the genes 3abc and a virus of which the genes 7ab were substituted. At both positions a stable expression did not take place.

4. Finally infection studies were done in order to prove the target cells of feline coronaviruses. At first freshly isolated PBMC and CD14-positive cells from SPF-cats were incubated with the GFP-expressing FCoV serotype I and II and the GFP expression was checked. While no GFP-expression could be observed in the cells after incubation with the serotype I GFP virus, a few CD14-positive cells and very few PBMC showed GFP-expression after incubation with the serotype II GFP virus. In another experiment monocytes/macrophages and CD14-positive cells which were isolated from blood of FCoV-seropositive cats, were infected with the serotype II GFP-virus at different time points after cultivation (24 h, 72 h, 168 h). The virus titer and the percentage of cells which were susceptible to infection increased when the cells were cultivated for several days before infection. 168 h after isolation the CD14-positive cells consisted mostly of macrophages. The increase of the virus titer as well as the rise of infected cells were caused by an efficient replication in a defined cell population, the monocytes/macrophages. FACS-analysis showed that the expression of CD13/fAPN in freshly isolated monocytes is very low.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
6-TG	6-Thioguanin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE2	<i>angiotensin converting enzyme2</i>
ADE	<i>antibody-dependent enhancement</i>
AMP	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APN	Aminopeptidase N
Arg	Arginin
as	Antisense-Oligonukleotid-Primer
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCoV	Bovines Coronavirus
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
BWCoV	Belugawal Coronavirus
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CCM	<i>cell culture medium</i>
CCoV	Canines Coronavirus
CoV	Coronaviren
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD13	<i>cluster of differentiation 13</i>
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEACAM1a	<i>murine carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a</i>

cm	Zentimeter
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalovirus
CrFK	<i>Crandell Feline Kidney</i>
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCs	dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-RNA	<i>defective</i> RNA
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECoV	Equines Coronavirus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (et alius)
EtOH	Ethanol
F	<i>forward</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
fAPN	feline Aminopeptidase N
FCoV	Felines Coronavirus
FCV	Felines Calicivirus
FCWF-4	<i>felis catus whole fetus-4</i>
FECV	Felines Enteriales Coronavirus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
FIPV	Felines Infektiöses Peritonitis Virus
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	Guaninmonophosphat
GPT	Guanin-Phosphoribosyltransferase
GUS	β- Glucoronidase
h	Stunde
hAPN	Humane Aminopeptidase N
HCoV-229E	Humanes Coronavirus-229E
HCoV-HKU1	Humanes Coronavirus-HKU1
HCoV-NL63	Humanes Coronavirus-NL63
HCoV-OC43	Humanes Coronavirus-OC43
HE	Hämagglutinin-Esterase
Hel	Helikase
HyX	Hypoxanthin
IBV	infektiöses Bronchitis Virus
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Ile	Isoleucin
IMP	Inosinmonophosphat
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase (= 1000 Basenpaare einer doppelsträngigen Nukleinsäure oder 1000 Basen eines einzelsträngigen Moleküls)
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L	<i>Leader</i>
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin</i>

LUC	Luciferase
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper
MEM	<i>minimal essential medium</i>
Met	Methionin
MHV	murines Hepatitis Virus
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPA	<i>mycophenolic acid</i>
M <sub>Pro</sub>	<i>main protease</i>
MRC-5	<i>human fetal lung fibroblast Zelllinie</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	mikro-
MW	Molekulargewicht
NendoU	<i>nidoviral uridylate-specific endoribonuclease</i>
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nsp	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
pAPN	porzine Aminopeptidase N
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEDV	<i>porcine epidemic diarrhoea virus</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
<i>Pfu</i>	<i>Pirococcus furiosus DNA Polymerase</i>
PFU	<i>plaque forming units</i>

pH	$-\log c (H^+)$
PhCoV	Fasanen Coronavirus
Phe	Phenylalanin
PK	Positivkontrolle
PL	papainähnliche Protease
Pol	Polarität
pp	Polyprotein
PRCoV	Porzines Respiratorisches Coronavirus
Pro	Prolin
PRRSV	Porzine Respirations und Reproduktions Syndrom Virus
R	<i>reverse</i>
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i>
RL	Renilla
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sense-Oligonukleotid-Primer
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> -Coronavirus
sec	Sekunde
Ser	Serin
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sg	subgenomisch
SOC	SOB ( <i>super optimal broth</i> ) Medium plus Glucose
sog.	sogenannte
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
ST	<i>swine testis</i>
SA-PC7	Streptavidin-Phycoerythrin-Cyanin 7
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris, Acetat, EDTA
Taq	<i>thermus aquaticus</i> DNA Polymerase



TCoV	Truthahn Coronavirus
TE	Tris, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TET	Tetracyclin
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Virus
Thr	Threonin
T <sub>m</sub>	<i>temperature of melting</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Trp	Tryptophan
TRS	Transkription-regulierende Sequenz
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u.a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
v/v	Volumenprozent
VLP	<i>virus-like particles</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X	Xanthin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranosid
XGPRT	Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
XMP	Xanthinmonophosphat
z.B.	zum Beispiel
ZPE	zytopathischer Effekt
Ω	Ohm

## 9. Literatur

**Addie, D. D., Jarrett, O.** 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec.* 1992 Feb 15; 130(7):133-137.

**Addie, D. D., Jarrett, O.** 2001. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec.* 148(21): 649-653.

**Addie, D. D., Schaap, A., Nicolson, L., Jarrett, O.** 2003. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol.* 84: 2735-2744.

**Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M. C.** 2009. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 11(7): 594-604. Review.

**Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.** 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10): 5516-5521.

**Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L.** 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol.* 78(22): 12683-12688.

**Almazan, F., Dediego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L.** 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 80(21): 10900-10906.

**Alonso, S., Sola, I., Teifke, J. P., Reimann, I., Izeta, A. Balsch, M., Plana-Duran, J., Moormann, R. J. M., Enjuanes, L.** 2002. *In vitro* and *in vivo* expression of foreign genes by transmissible gastroenteritis coronavirus-derived minigenomes. Journal of General Virology, 83, 567-579.

**Ashmun, R. A., Look, T. A.** 1990. Metalloprotease Activity of CD13/Aminopeptidase N on the Surface of Human Myeloid Cells. Blood 75 No.2:462-469.

**Baca-Estrada, M. E., Liang, X., Babiuk, L. A., Yoo, D.** 1995. Induction of mucosal immunity in cotton rats to haemagglutinin-esterase glycoprotein of bovine coronavirus by recombinant adenovirus. Immunology 1995 86 134-140.

**Baric, R. S., Nelson, G. W., Fleming, J. O., Deans, R. J., Keck, J. G., Casteel, N., Stohlman, S. A.** 1988. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. J Virol. 62(11): 4280-4287.

**Bender, S. J., Phillips, J. M., Scott, E. P., Weiss, S. R.** 2010. Murine coronavirus receptors are differentially expressed in the central nervous system and play virus strain-dependent roles in neuronal spread. J Virol. 84(21): 11030-11044.

**Berry, J. D., Hay, K., Rini, J. M., Yu, M., Wang, L., Plummer, F. A., Corbett, C. R., Andonov, A.** 2010. Neutralizing epitopes of the SARS-CoV S-protein cluster independent of repertoire, antigen structure or mAb technology. MAbs. 2(1): 53-66.

**Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., Estes, M. K.** (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. J Virol 77(21): 11603-11615.

**Black, J. W.** 1980. Recovery an *in vitro* cultivation of a coronavirus from laboratory-induced cases of Feline Infectious Peritonitis (FIP). Vet Med Small Anim Clin. 75 (5), 811-814.

**Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M., Rottier, P. J. M.** 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*. Vol. 77, No. 16, 8801-881.

**Bosch, B. J., de Haan, C. A., Rottier, P. J.** 2004. Coronavirus spike glycoprotein, extended at the carboxy terminus with green fluorescent protein, is assembly competent. *J Virol*. 78(14): 7369-7378.

**Brian, D. A., Baric, R. S.** 2005. Coronavirus Genome Structure and Replication. In: Enjuanes, L. (Ed.), *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*. Springer Verlag Berlin.

**Brown, M. A., Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E., O'Brian, S. J.** 2009. Genetics and Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Virus. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 15, No. 9, 1445-1452.

**Bukowska, A.** 2002. Isolierung und biochemische Charakterisierung einer zytosolischen Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9. Diss. Dr. rer. nat., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

**Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D., and Britton, P.** 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*. 75(24): 12359-12369.

**Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., and Britton, P.** 2005. Gene 5 of the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Is Not Essential for Replication. *J Virol*. 8065-8078.

**Cavanagh, D.** 1995. The coronavirus surface protein. In *The Coronaviridae*, S. G. Siddell, ed. (New York, Plenum Press), pp. 73-103.

**Cavanagh, D., Mawditt, K., Sharma, M., Drury, S. E., Ainsworth, H. L., Britton, P., Gough, R. E.** 2001. Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.* 30:355-30368.

**Cavanagh, D., Mawditt, K., Dde, B. W., Britton, P., Gough, R. E.** 2002. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.* 31:3181-3193.

**Cavanagh, D., Casais, R., Armesto, M., Hodgson, T., Izadkhasti, S., Davies, M., Lin, F., Tarpey, I., Britton, P.** 2007. Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine.* 25(30): 5558-5562.

**Cervantes-Barragan, L., Züst, R., Maier, R., Sierro, S., Janda, J., Levy, F., Speiser, D., Romero, P., Rohrlisch, P.-S., Ludewig, B., Thiel, V.** 2010. Dendritic Cell-Specific Antigen Delivery by Coronavirus Vaccine Vectors Induces Long-Lasting Protective Antiviral and Antitumor Immunity. *mBio*, 1(4): e00171-10.

**Chang, H. W., de Groot, R. J., Egberink, F., Rottier, P. J. M.** 2010. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *Journal of General Virology.* 91: 415-420.

**Chang, H. W., Egberink, H. F., Halpin, R., Spiro, D. J., Rottier, P. J.** 2012. Spike Protein Fusion Peptide and Feline Coronavirus Virulence. *Emerg Infect Dis.* 18: 1089-1095.

**Christianson, K. K., Ingersoll, J. D., Landon, R. M., Pfeiffer, N. E., Gerber, J. D.** 1990. Characterization of a temperature sensitive feline infectious peritonitis coronavirus. *Arch Virol.* 109(3-4): 185-196.

**Coley, S. E., Lavi, E., Sawicki, S. G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S. G., and Thiel, V.** 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol.* 79(5): 3097-106.

**Corapi, W. V., Olsen, C. W., Scott, F. W.** 1992. Monoclonal Antibody Analysis of Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Feline Infectious Peritonitis Virus. *Journal of Virology.* 6695-6705.

**Curtis, K. M., Yount, A. C., Baric, R. S.** 2002. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J. Virol.* 76: 1422-1434.

**Dalton, K. P., Rose, J. K.** 2001. Vesicular stomatitis virus glycoprotein containing the entire green fluorescent protein on its cytoplasmic domain is incorporated efficiently into virus particles. *Virology.* 279 (2): 414-421.

**de Groot, R. J., ter Haar, R. J., Horzinek, M. C., van der Zeijst, B. A.** 1987a. Intracellular RNAs of the feline infectious peritonitis coronavirus strain 79-1146. *J. Gen. Virol.* 68, 995-1002.

**de Groot, R. J., Maduro, J., Lenstra, J. A., Horzinek, M. C., van der Zeijst, B. A., Spaan, W. J.** 1987b. cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J Gen Virol.* 68: 2639-2646.

**de Groot, R. J., Andeweg, A. C., Horzinek, M. C., Spaan, W. J.** 1988. Sequence analysis of the 3'-end of the feline coronavirus FIPV 79-1146 genome: comparison with the genome of porcine coronavirus TGEV reveals large insertions. *Virology.* 167(2): 370-376.

**de Groot, R. J., Horzinek, M. C.** 1995. Feline Infectious Peritonitis. In: *The Coronaviridae*, S. G. Siddell, ed. (New York, Plenum Press), pp. 293-309.

**de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., Perlman, S. Poon, L., Rottier, P. J. M., Talbot, P. J., Woo, P. C. Y., Ziebuhr, J.** 2012. Family *Coronaviridae*. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (Eds.), Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 806-828.

**de Haan, C. A. M., Masters, P. S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, J. M.** 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by revers genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 279: 414-421.

**de Haan, C. A. M., van Genne, L., Stoop, J. N., Volders, H., Rottier, J. M.** 2003. Coronaviruses as Vectors: Position Dependence of Foreign Gene Expression. *Journal of Virology*, p. 11312-11323.

**de Haan, C. A. M., Haijema, B. J., Boss, D., Heuts, F. W. H., Rottier, J. M.** 2005. Coronaviruses as Vectors: Stability of Foreign Gene Expression. *Journal of Virology*, p. 12742-12751.

**Delmas, B., Laude, H.** 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol.* 64(11): 5367-5375.

**Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjöström, H., Norén, O., Laude, H.** 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* 357 (6377): 417-420.

**Delmas, B., Gelfi, J., Sjöström, H., Noren, O, Laude, H.** 1993. Further characterization of amniopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv Exp Med Biol.* 342: 293-298.

**Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Nauwynck, H. J.** 2005. Replikation of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol* (2005) 150: 2483-2500.

**Donaldson, E. F., Yount, B., Sims, A. C., Burkett, S., Pickles, R. J., Baric, R. S.** 2008. Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J Virol.* 82 (23): 11948-11957.

**Duan, X., Nauwynck, H. J., Pensaert, M. B.** 1997. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol* 142, 2483-2497.

**Dye, C., Siddell, S. G.** 2005. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol.* 86: 224922-53.

**Dye, C., Temperton, N., Siddell, S. G.** 2007. Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines. *J Gen Virol.* 88 (Pt 6): 1753-1760.

**Enjuanes, L., Brian, D., Cavanagh, D., Holmes, K., Lai, M. M. C., Laude, H., Masters, P., Rottier, P., Siddell, S. G., Spaan, W. J. M., Taguchi, F., Talbot, P.** 2000. Coronaviridae. In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carsten, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., McGeoch, D. J., Maniloff, J., Mayo, M. A., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* Academic Press, New York, pp. 835-849.

**Enjuanes, L., Sola, I., Almazan, F., Ortego, J., Izeta, A., Gonzales, J. M., Alonso, S., Sanchez, J. M., Escors, D., Calvo, E., Riquelme, C., Sanchez, C.** 2001. Coronavirus derived expression system. *Journal of Biotechnology* 88: 183-204.

**Evermann, J. F., Baumgartener, L., Ott, R. L., Davis, E. V., McKeirnan, A. J.** 1981. Characterization of a feline infectious peritonitis virus isolate. *Vet Pathol.* 18: 256-265.

**Falkner, F. G., Moss, B.** 1988. Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol.* 62(6): 1849-1854.



**Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzyńska-Kokorniak, A., Figlerowicz, M.** 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev.* 23 (4): 488-518.

**Fischer, F., Stegen, C. F., Koetzner, C. A., Masters, P. S.** 1997. Analysis of a Recombinant Mouse Hepatitis Virus Expressing a Foreign Gene Reveals a Novel Aspect o Coronavirus Transcription. *Journal of Virology.* 5148-5160.

**Garner, M. M., Ramsell, K., Morera, N., Juan-Sallés, C., Jiménez, J., Ardiaca, M., Montesinos, A., Teifke, J. P., Löhr, C. V., Evermann, J. F., Baszler, T. V., Nordhausen, R. W., Wise, A. G., Maes, R. K., Kiupel, M.** 2008. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Vet Pathol.* 45(2): 236-246.

**Geissler, K., Schneider, K., Fleuchaus, A., Parrish, C. R., Sutter, G., Truyen, U.** (1999). Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells. *J. Virol.* 73, 834-838.

**Gendelmann, H. E., Morahan, P. S.** 1992. Macrophages in viral infections. In: Lewis, C. E., McGee, J. O. D. (eds) *The Macrophages*. IRL Press, New York, pp 157-213.

**Gerber, J. D., Ingersoll, J. D., Gast, A. M., Christianson, K. K., Selzer, N. L., Landon, R. M., Pfeiffer, N. E., Sharpee, R. L., Beckenhauer, W. H.** 1990. Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine. *Vaccine* 8: 536-542.

**Goebel, S. J., Hsue, B., Dombrowski, T. F., Masters, P. S.** 2004. Characterization of the RNA components of a putative molecular switch in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J Virol.* 78(2): 669-682.

**Goitsuka, R., Ohashi, T., Ono, K., Yasukawa, K., Koishibara, Y., Fukui, H., Oshugi, Y., Hasegawa, A.** 1990. IL-6 activity in feline infectious peritonitis. *J Immunol* 144: 2599–2603.

**González, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L.** 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. Arch Virol. 148: 2207-2235.

**Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., Blinov, V. M.** 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. Nucleic Acids Res. 17(12): 4847–4861.

**Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., and Snijder, E.J.** 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. Virus Res. 117(1): 17-37.

**Hackney, K., Cavanagh, D., Kaiser, P., Britton, P.** 2003. In Vitro and In Ovo Expression of Chicken Gamma Interferon by a Defective RNA of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. Journal of Virology, 5694-5702.

**Haijema, B. J., Volders, H., Rottier, P. J.** 2003. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. J Virol. 77 (8): 4528-4538.

**Haijema, B. J., Volders, H., Rottier, P. J.** 2004. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. J Virol. 78 (8): 3863-3871.

**Haijema, B. J., de Groot-Mijnes, J. D., Vennema, H., Raamsman, M. J., Rottier, P. J., de Groot, R. J.** 2005. GenBank accession number AY994055.

**Haijema, B. J., Rottier, P. J., de Groot, R. J.** 2007. Feline coronaviruses: a tale of two-faced types, p.183-203. In V. Thiel (ed.), Coronaviruses. Molecular and cellular biology. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

**Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 166 (4): 557-580.

**Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjöström, H., Norén, O.** 1998. The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol.* 72 (1): 527-534.

**Hasegawa, T., Hasegawa, A.** 1991. Interleukin 1 alpha mRNA-expressing cells on the local inflammatory response in feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci.* 53(6): 995-999.

**Herrewegh, A. A., Mähler, M., Hedrich, H. J., Haagmans, B. L., Egberink, H. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J., de Groot, R. J.** 1997. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology.* 234(2): 349-363.

**Herrewegh, A. A., Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J., de Groot, R. J.** 1998. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol.* 72 (5): 4508-4514.

**Hertzog, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S. G., Ludewig, B., Thiel, V.** 2004. Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol.* 85 (Pt 6): 1717-1725.

**Hirai, A., Ohtsuka, N., Ikeda, T., Taniguchi, R., Blau, D., Nakagaki, K., Miura, H. S., Ami, Y., Yamada, Y. K., Itohara, S., Holmes, K. V., Taguchi, F.** 2010. Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor murine CEACAM1 in the resistance of mice to MHV infection: studies of mice with chimeric mCEACAM1a and mCEACAM1b. *J Virol.* 84 (13): 6654-6666.

**Hohdatsu, T., Okada, S., Koyama, H.** 1991. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. *Arch Virol.* 117(1-2): 85-95.

**Hohdatsu, T., Okada, S., Ishizuka, Y., Yamada, H., Koyama, H.** 1992. The prevalence of types I and II feline coronavirus infection in cats. *J Vet Med Sci.* 54: 557-562.

**Hohdatsu, T., Yamada, M., Tominaga, R., Makino, K., Kida, K., Koyama, H.** 1997. Antibody-Dependent Enhancement of Feline Infectious Peritonitis Virus Infection in Feline Alveolar Macrophages and Human Monocyte Cell Line U937 by Serum of Cats Experimentally or Naturally Infected with Feline Coronavirus. *J. Vet. Med. Sci.* 60 (1): 49-55.

**Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K., Koyama, H.** 1998. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol.* 143(5): 839-850.

**Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., Pöhlmann, S.** 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (22): 7988-7993.

**Holzworth, J.** 1963. Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* 53: 157-160.

**Horsburgh, B. C., Brierley, I., Brown, D. K.** 1992. Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *Journal of General Virology.* 73: 2849-2862.

**Hoshino, Y., Scott, F. W.** 1978. Brief communication: replication of feline infectious peritonitis virus in organ cultures of feline tissue. *Cornell Vet.* 68(3): 411-417.

**Hsue, B., Masters, P. S.** 1999. Insertion of a new transcriptional unit into the genome of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 73: 6128-6135.

**Huang, P., Lai, M. M. C.** 2000. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Binds to the 3'-Untranslated Region and Mediates Potential 5'-3'-End Cross Talks of Mouse Hepatitis Virus RNA. *J Virol.* 75 (11): 5009–5017.

**Hurley, K. F., Sykes, J. E.** 2003. Update on feline calicivirus: new trends. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33 (4): 759-772.

**Hurley, K. E., Pesavento, P. A., Pedersen, N. C., Poland, A. M., Wilson, E., Foley, J. E.** 2004. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J Am Vet Med Assoc.* 224 (2): 241-249.

**Hurst, K. R., Ye, R., Goebel, S. J., Jayaraman, P., Masters, P. S.** 2010. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol.* 84(19): 10276-10288.

**Huschak, G., Zur Nieden, K., Stuttmann, R., Riemann, D.** 2003. Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin Exp Immunol.* 134 (3): 491-496.

**Imai, Y., Kuba, K., Ohto-Nakanishi, T., Penninger, J. M.** 2010. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J.* 74(3): 405-410.

**Isaacs, S. N., Kotwal, G. J., Moss, B.** 1990. Reverse guanine phosphoribosyltransferase selection of recombinant vaccinia viruses. *Virology.* 178(2): 626-630.

**Ito, N., Mossel, E. C., Narayanan, K., Popov, V. L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C. J., Makino, S. J.** 2005. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3a Protein Is a Viral Structural Protein. *Viol ;* 79: 3182-3186.

**Ivanov, K. A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J.** 2004. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (34): 12694-12699.

**Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Mendez, A., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.** (1999). Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *Journal of Virology.* 73, 1535-1545.

**Jeffers, S. A., Tusell, S. M., Gillim-Ross, L.** 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (44): 15748-15753.

**Jeffers, S. A., Hemmila, E. M., Holmes, K. V.** 2006. Human coronavirus 229E can use CD209L (L-Sign) to enter cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 581: 265-269.

**Kennedy, M., Boedecker, N., Gibbs, P., Kania, S.** 2001. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with the epidemic of feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*. 81: 227-234.

**Kennedy, M., Citino, S., McNabb, A. H., Moffatt, A. S., Gertz, K., Kania, S.** 2002. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. *J Vet Diagn Invest*. 14: 520-522.

**Kennedy, M., Abd-Eldaim, M., Zika, S. E., Mankin, J. M., Kania, S.** 2008. Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. *Am J Vet Res*. 69: 1179-1182.

**Kenny, A. J., Maroux, S.** (1982). Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiol Rev*. 62: 91-128.

**Kipar, A., May, S., Menger, M., Weber, M., Leukert, W., Reinacher, M.** 2005. Ulomatous Vasculitis in Feline Infectious Peritonitis. *Vet Pathol*. 42: 321-330.

**Kipar, A., Meli, M. L., Failing, K., Euler, T., Gomes-Keller, M. A., Schwartz, D., Lutz, H., Reinacher, M.** 2006. Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 112(3-4): 141-155.

**Koetzner, C. A., Parker, M. M., Ricard, C. S., Sturman, L. S., Masters, P. S.** 1992. Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J Virol*. 66 (4): 1841-1848.

**Kummrow, M., Meli, M. L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N. C., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H.** 2005. Feline Coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. Clin Diagn Lab Immunol. 12: 1209-1215.

**Kuo, L., Godeke, G. J., Raamsman, M. J., Masters, P. S., Rottier, P. J.** 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. J Virol. 74 (3): 1393-406.

**Lai, M. M. C., Cavanagh, D.** 1997. The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res. 48: 1-100.

**Lai, M. M. C., Zhang, X., Hinton, D., Stohlman, S.** 1997. Modulation of mouse hepatitis virus infection by defective-interfering RNA-mediated expression of viral proteins and cytokines. J Neurovirol. 1: 33-34.

**Lai, M. M. C., Holmes, K. V.** 2001. *Coronaviridae*: the viruses and their replication. In Fields Virology, 4th edition, 1163-1185.

**Lai, M. M. C., Perlman, S., and Anderson, L.J.** 2007. Coronaviridae. In Fields Virology, D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, New York Volume I: p. 1305-1333.

**Langereis, M. A., van Vliet, A. L. W., Boot, W., de Groot, R. J.** 2010. Attachment of Mouse Hepatitis Virus to O-Acetylated Sialic Acid Is Mediated by Hemagglutinin-Esterase and Not by the Spike Protein. Journal of Virology, Sept. 2010, p. 8970–8974.

**Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., Farzan, M.** 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature. 426 (6965): 450-454.

- Li, B. X., Ge, J. W., Li, Y. J.** 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*. 365 (1): 166-172.
- Liao, C. L., Lai, M. M.** 1995. A cis-acting viral protein is not required for the replication of a coronavirus defective-interfering RNA. *Virology*. 209 (2): 428-436.
- Lin, Y. J., Lai, M. M. C.** 1993. Deletion mapping of a mouse hepatitis virus defective interfering RNA reveals the requirement of an internal and discontinuous sequence for replication. *J. Virol.* 67, 6110-6118.
- Lin, T. L., Loa, C. C., Wu, C. C.** 2004. Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. *Virus Res.* 10661-10670.
- Lin, C. N., Su, B. L., Wang, C. H., Hsieh, M. W., Chueh, T. J., Chueh, L. L.** 2008. Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan. *Vet Microbiol.* 136(3-4): 233-239.
- Liu, D. X., D. Cavanagh, P. G., Inglis, S. C.** 1991. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 184531-184544.
- Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Peiper, S. C.** 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest.* 83 (4): 1299-1307.
- Lu, W., Zheng, B. J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C. K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V., Sun, B.** 2006. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (33): 12540-12545.
- Luttermann, C., Meyers, G.** 2007. A Bipartite Sequence Motif Induces Translation Reinitiation in Feline Calicivirus RNA. *J Biol Chem.* 282(10): 7056-7065.



**Mallick, B., Ghosh, Z., Chakrabarti, J.** 2009. MicroRNome Analysis Unravels the Molecular Basis of SARS Infection in Bronchoalveolar Stem Cells. *PLoS One*, 4 (11): e7837.

**Masters, P. S.** 1999. Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv Virus Res.* 53: 245-264.

**Masters, P. S., Rottier, P. J.** 2005. Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 287: 133-159.

**Masters, P. S.** 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 66: 193-292.

**Marra, M. A., Jones, S. J .M., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S. N., Khattra, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C., Roper, R. L.** (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300: 1399-1404.

**McCabe, V. J., Tarpey, I., Spibey, N.** 2002. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine* 20, 2454-2462.

**McCabe, V. J., Spibey, N.** 2005. Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine* 23, 5380-5388.

**McKeirnan, A. J., Evermann, J. F., Hargis, A., Miller, L. M., Ott, R. L.** 1981. Isolation of feline coronaviruses from two cats with diverse disease manifestations. *Feline Pract.* 11: 16-20.

**Merchlinsky, M., Moss, B.** 1992. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology.* 190(1): 522-526.

**Mihindukulasuriya, K. A., Wu, G., St. Leger, J. Nordhausen, R. W., Wang, D.** 2008. Identification of a Novel Coronavirus from a Beluga Whale by Using a Panviral Microarray. *J Virol.* 82 (10): 5084-5088.

**Motokawa, K., Hohdatsu, T., Aizawa, C., Koyama H., Hashimoto, H.** 1995. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. *Archives of Virology*, Volume 140, Number 3, Seiten 469-480.

**Motokawa, K., Hohdatsu, T., Hashimoto, H., Koyama, H.** 1996. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol.* 40(6): 425-433.

**Müller, M. A., van der Hoek, L., Voss, D., Bader, O., Lehmann, D., Schulz, A. R., Kallies, S., Suliman, T., Fielding, B. C., Drosten, C., Niedrig, M.** 2010. Human Coronavirus NL63 Open Reading Frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *Virol J.* 7: 6.

**Mulligan, R., Berg, P.** 1981. Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 78, No. 4, pp 2072-2076.

**Narayanan, K., Huang, C., Makino, S.** 2008. SARS coronavirus Accessory Proteins. *Virus Res.* 133 (1): 113–121.

**Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T.** 2004. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol.* 78 (16): 8701-8708.

**Ontiveros, E., Kuo, L., Masters, P. S., Perlman, S.** 2001. Inactivation of Expression of Gene 4 of Mouse Hepatitis Virus Strain JHM Does Not Affect Virulence in the Murine CNS. *Virology.* 289, 230-238.

**O'Reilly, K. J., Fishman, B., Hitchcock, L. M.** 1979. Feline infectious peritonitis: isolation of a coronavirus. *Vet Rec.* 104(15) :348.

**Ortego, J., Sola, F., Almazan, J., Ceriani, J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., Enjuanes, L.** 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology* 308: 13-22.

**Page, K. W., Mawditt, K. L., Britton, P.** 1991. Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Journal of General Virology.* 72: 579-587.

**Pasternak, A. O., van den Born, E., Spaan, W. J., Snijder, E. J.** 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* 20 (24): 7220-7228.

**Pasternak, A. O., Spaan, W. J. M., Snijder, E. J.** 2006. Nidovirus transcription: how to make sense...? *Journal of General Virology*, 87, 1403-1421.

**Pedersen, N. C.** 1976. Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am J Vet Res.* 37(5): 567-572.

**Pedersen, N. C., Boyle, J. F., Floyd, K., Fudge, A., Barker, J.** 1981. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 42(3): 368-377.

**Pedersen, N. C., Black, J. W., Boyle, J. F., Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Ott, R. L.** 1984. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol.* 1984. 173: 365-80.

**Pedersen, N. C., Allen, C. E., Lyons, L. A.** 2008. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg.* 10 (6): 529-541.

**Pedersen, N. C., Liu, H., Dodd, K. A., Pesavento, P. A.** 2009. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. *Viruses.* 1: 166-184.

**Peng, D., Koetzner, C. A., Masters, P. S.** 1995. Analysis of Second-Site Revertants of a Murine Coronavirus Nucleocapsid Protein Deletion Mutant and Construction of Nucleocapsid Protein Mutants by Targeted RNA Recombination. *Journal of Virology*, p. 3449–3457 Vol. 69, No. 6.

**Poland, A. M., Vennema, H., Foley, J. E., Pedersen, N. C.** 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* 34 (12): 3180-3184.

**Pratelli A.** 2011. Basic science track. Entry and release of canine coronavirus from polarized epithelial cells. *New Microbiol.* 34 (1): 25-32.

**Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J.** 2005. ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol.* 79 (20): 12721-12731.

**Qiu, Z., Hingley, S. T., Simmons, G., Yu, C., Das Sarma, J., Bates, P., Weiss, S. R.** 2006. Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J Virol.* 80 (12): 5768-5776.

**Rasschaert, D., Gelfi, J., Laude, H.** 1987. Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression. *Biochimie.* 69 (6-7): 591-600.

**Regan, A. D., Whittaker, G. R.** 2010. Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells. *Journal of Virology*. 82 (23): 11992-11996.

**Rottier, P. J.** 1999. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet Microbiol*. 69 (1-2): 117-125.

**Rottier, P. J., Nakamura, K., Schellen, P., Volder, H., Haijema, B. J.** 2005. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*. 14122-14130.

**Sanchez, C.M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.** 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol*. 73 (9): 7607-18.

**Sarma, J. D., Scheen, E., Seo, S. H., Koval, M., Weiss, S. R.** 2002. Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. *J Neurovirol*. 8(5): 381-391.

**Sawicki, S. G., Sawicki, D. L.** 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*. 380: 499-506.

**Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., Younker, D., Meyer, Y., Thiel, V., Stokes, H., Siddell, S. G.** 2005. Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins. *PLoS Pathog*. 1(4): e39.

**Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S. G., Thiel, Volker.** 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 6620-6630.

**Schumann, R. R., Rietschel, E. T., Loppnow, H.** 1994. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol*. 183 (6): 279-297.

- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A., Alazawy, A.** 2010. Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Vet Med Int.* pii: 809480.
- Shipp, A. M., Look, A. T.** 1993. Hämatopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane-Associated Enzymes: Cutting is the key? *Blood* 82 (4): 1052-1070.
- Siddell, S. G.** 1995. *The Coronaviridae*. New York: Plenum Press.
- Simmons, D. L., Tan, S., Tenen, D. G., Nicholson-Weller, A., Seed, B.** 1989. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*. 73 (1): 284-289.
- Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L., Bates, P.** 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (33): 11876-11881.
- Sladek, Z., Rysanek, D.** 2008. Expression of macrophage CD44 receptor in the course of experimental inflammatory responses induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide E. *Veterinarni Medicina* 53, 347-357.
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon LL, Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J., Gorbalenya, A. E.** 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol.*; 331 (5): 991-1004.
- Sola, I., Alonso, S., Zuniga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.** 2003. Engineering the Transmissible Gastroenteritis Virus Genome as an Expression Vector Inducing Lactogenic Immunity. *Journal of Virology*, 4357-4369.
- Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B. A., Siddell, S. G.** 1983. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J.* 2(10): 1839-1844.

**Stephensen, C. B., Casebolt, D. B., Gangopadhyay, N. N.** 1999. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 60 (2): 181-189.

**Stirrup, K., Shaw, K., Evans, S., Dalton, K., Casais, R., Cavanagh, D., Britton, P.** 2000. Expression of reporter genes from the defective RNA CD-61 of the coronavirus infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology*, 81, 1687-1698.

**St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P.J.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol.* 80 (7): 3670-3674.

**Stoddart, C. A., Scott, F. W.** 1989. Intrinsic Resistance of Feline Peritoneal Macrophages to Coronavirus Infection Correlates with In Vivo Virulence. *Journal of Virology.* 436-440.

**Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L. L., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J. M., Stuart, D. I.** 2004. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure.* 12 (2): 341-353.

**Taguchi, F.** 1995. The S2 Subunit of the Murine Coronavirus Spike Protein Is Not Involved in Receptor Binding. *Journal of Virology*, 7260-7263.

**Taguchi, F., Schimazaki, Y. K.** 2000. Functional analysis of an epitope in the S2 subunit of the murine coronavirus spike protein: involvement in fusion activity. *Journal of General Virology.* 81, 2867-2871.

**Takano, T., Hohdatsu, T., Toda, A., Tanabe, M., Koyama, H.** 2007. TNF- $\alpha$ , produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology.* 364 (1): 64-72.

**Takano, T., Kawakami, C., Yamada, S. Satoh, R., Hohdatsu, T.** 2008. Antibody-Dependent Enhancement Occurs Upon Re-Infection with the Identical Serotype Virus in Feline Infectious Peritonitis Virus Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 70 (12): 1315-1321.

**Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V., Thiel, H. J.** 2008a. Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *J Virol.* 82 (4): 1851-1859.

**Tekes, G.** 2008b. Etablierung eines Revers-genetischen Systems für feline Coronaviren. Diss. PhD, Universität Gießen.

**Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Bank-Wolf, B., Maier, R., Thiel, H. J., Thiel, V.** 2010. Chimeric Feline Coronaviruses That Encode Type II Spike Protein on Type I Genetic Background Display Accelerated Viral Growth and Altered Receptor Usage. *Journal of Virology.* 1326-1333.

**Tekes, G., Spies, D., Bank-Wolf, B., Thiel, V., Thiel, H. J.** A Reverse Genetic Approach to Study Feline Infectious Peritonitis. 2012. *Journal of Virology.*

**Terada, Y., Shiozaki, Y., Shimoda, H., Mahmoud, H. Y., Noguchi, K., Nagao, Y., Shimojima, M., Iwata, H., Mizuno, T., Okuda, M., Morimoto, M., Hayashi, T., Tanaka, Y., Mochizuki, M., Maeda, K.** 2012. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. *J Gen Virol.* 93 (Pt 9): 1930-1934.

**Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S. G.** 2001a. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol.* 75 (14): 6676-6681.

**Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S.G.** 2001b. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 82, 1237-1281.



**Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J.** 2003a. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol.* 84(Pt 9): 2305-2315.

**Thiel, V., Karl, N., Schelle, B., Disterer, P., Klagge, I., Siddell, S. G.** 2003b. Multigene RNA Vector Based on Coronavirus Transcription. *Journal of Virology*, 9790-9798.

**Thiel, V., Siddell, S. G.** 2005. Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 287: 199-227.

**Thiel, V.,** 2007. Reverse Genetic Analysis of Coronavirus Replication. In: Thiel, V. (Ed.) *Coronaviruses*. Caister Academic Press, UK.

**Thiel, V., Weber, F.** 2008. Interferon and cytokine response to SARS-coronavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (2): 121-132.

**Thumfart, J. O., Meyers, G.** (2002). Feline calicivirus. Recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J. Virol.* 76, 6398–6407.

**Tresnan, D. B., Levis, R., Holmes, K. V.** 1996. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol.* 70 (12): 8669-8674.

**Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Nauwynck, H. J.** 2007. Attachment and internalization of feline infectious peritonitis virus in feline blood monocytes and Crandell feline kidney cells. *J Gen Virol.* 88 (Pt 9): 2527-2532.

**Van Hamme, E., Desmarets, L., Dewerchin, H. L., Nauwynck, H. J.** 2011. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res.* 160(1-2): 32-39.

**Vennema, H., de Groot, R. J., Harbour, D. A., Dalderup, M., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C., Spaan, W. J.** 1990. Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *J Virol.* 64(3): 1407-1409.

**Vennema, H., de Groot, R. J., Harbour, D. A., Horzinek, M. C., Spaan, W. J.** 1991. Primary structure of the membrane and nucleocapsid protein genes of feline infectious peritonitis virus and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses in kittens. *Virology.* 181(1): 327-335.

**Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N. C.** 1998. Feline Infectious Peritonitis Virus Arise by Mutation from Endemic Feline Enteric Coronaviruses. *Virology.* 243: 150-157.

**Vennema, H.** 1999. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol.* 69 (1-2): 139-141.

**Waring, M. J.** 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol.* 13 (1): 269-282.

**Wentworth, D. E., Holmes, K. V.** 2007. Coronavirus binding and entry, p.3-31. In V. Thiel (ed.), *Coronaviruses. Molecular and cellular biology.* Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

**Weiss, R. C., Scott, F. W.** 1981. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: pathologic changes and immunofluorescence. *Am J Vet Res.* 42 (12): 2036-2048.

**Weiss, R. C., Vaughn, D. M., Cox, N. R.** 1988. Increased plasma levels of leukotriene B4 and prostaglandin E2 in cats experimentally inoculated with feline infectious peritonitis virus. *Vet Res Commun.* 12(4-5): 313-323.

**Weiss, S. R., Navas-Martin, S.** 2005. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(4): 635 - 664.

**Wertz, G. W., Moudy, R., Ball, L. A.** 2002. Adding genes to the RNA genome of vesicular stomatitis virus: Positional effects on stability of expression. *J. Virol.* 76, 7642-7650.

**Wesseling, J. G., Vennema, H., Godeke, G. J., Horzinek, M. C., Rottier, P. J.** 1994. Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *J Gen Virol.* 75 ( Pt 7): 1789-1794.

**Williams, J. C., Liu, B. L., Lambden, P. R., Clarke, I. N.** 1997. Expression of SRSV ORFs 2 and 3: assembly of virus-like particles is independent of ORF3 activity. In: Chasey, D., Gaskell, R. M., Clarke, I. N. (ed.). *Proceedings of the First International Symposium on Caliciviruses*. Reading, United Kingdom: European Society for Veterinary Virology; 1997. pp. 51–58.

**Wolfe, L. G., Griesemer, R. A.** 1966. Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet.* 3(3): 255-270.

**Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lai, K. K., Huang, Y., Lee, P., Luk, G. S., Dyrting, K. C., Chan, K. H., Yuen, K. Y.** 2009. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J Virol.* 83 (2): 908-917.

**Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., Yuen, K.-Y.** 2010. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses.* 2, 1804-1820.

**Wurzer, W. J., Obojes, K., Vlasak, R.** 2002. The sialate-4-O-acetylsterases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 *Coronaviridae*. *Journal of General Virology.* 83, 395-402.

**Yamanaka, M., Crisp, T., Brown, R., Dale, B.** 1998. Nucleotide sequence of the inter-structural gene region of feline infectious peritonitis virus. *Virus Genes.* 16 (3): 317-318.

**Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., Holmes, K. V.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 1992 Jun 4;357(6377):420-2.

**Youn, S., Leibowitz, J.L., and Collisson, E.W.** 2005. In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology*. 332 (1): 206-15.

**Yount, B., Curtis, K.M., and Baric, R.S.** 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol*. 74 (22): 10600-10611.

**Yount, B., Denison, M. R., Weiss, S. R., and Baric, R. S.** 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol*. 76 (21): 11065-11078.

**Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., and Baric, R.S.** 2003. Reverse genetics with a full length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100 (22): 12995-13000.

**Yount, B., Roberts, R. S., Sims, A. C., Deming, D., Frieman, M. B., Sparks, J., Denison, M. R., Davis, N., Baric, R. S.** 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J Virol*. 79 (23): 14909-14922.

**Zhang, X., Hinton, D. R., Cua, D. J., Stohlman, S. A., Lai, M. M. C.** 1997. Expression of Interferon- $\gamma$  by a Coronavirus Defective-Interfering RNA Vector and Its Effect on Viral Replication, Spread, and Pathogenicity. *Virology* 233, 327-338.

**Ziebuhr, J., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*. 81(Pt 4): 853-879.

**Zook, B. C., King, N. .W., Robison, R. L., McCombs, H. L.** 1968. Ultrastructural Evidence for the Viral Etiology of Feline Infectious Peritonitis. Path. vet. 5: 91-95.

**Zúñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L.** 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. J Virol. 78(2): 980-994.

## 10. Publikationen, Vorträge und Poster

### 10.1 Publikationen

1. Tekes, G., **Spies, D.**, Bank-Wolf, B., Thiel, V., Thiel, H. J. A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. J Virol. 2012 Jun; 86(12): 6994-6998.

### 10.2 Vorträge

1. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, V., Thiel, H. J.  
Studies on tropism of feline coronaviruses using a reverse genetic approach.  
PhD Student Meeting, Münchenwiler 2009

### 10.3 Poster

1. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, H. J.  
Molecular characterization of cellular tropism of feline coronaviruses using a reverse genetic approach.  
2nd Annual GGL Conference, Gießen 2009
2. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, V., Thiel, H. J.  
Studies on tropism of feline coronaviruses using a reverse genetic approach.  
Fourth European Congress of Virology, Cernobbio, Italien 2010
3. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, H. J.  
Generation of recombinant FCoV and their phenotype.  
3rd Annual GGL Conference, Gießen 2010
4. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, V., Thiel, H. J.  
Generation and characterization of a GFP-expressing recombinant serotype II feline coronavirus  
4th Annual GGL Conference, Gießen 2011
5. **Spies, D.**, Tekes, G., Thiel, V., Thiel, H. J.  
Generation and characterization of a GFP-expressing recombinant serotype II feline coronavirus  
22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Essen 2012

## 11. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Fachbereich 08-Biologie und Chemie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie, Fachbereich 10-Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen, unter der Betreuung von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel angefertigt. Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert:

Verbundprojekt: Ökologie und Pathogenese von SARS: Vergleich von feline CoV mit SARS-CoV (Teilprojekt 5); Förderkennzeichen: 01KI1005D

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in dieser Zeit direkt oder indirekt unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Möglichkeit zur Promotion, die interessante Themenstellung, die fachliche und engagierte Betreuung und Unterstützung sowie für die vielseitigen Anregungen und für ein äußerst freundliches Arbeitsverhältnis.
- Prof. Dr. Alfred Bindereif danke ich herzlich für die Begutachtung meiner Dissertation.
- Prof. Dr. Tina Trenczek und Prof. Dr. John Ziebuhr danke ich sehr für Ihre Bereitschaft als Prüfer meiner Disputation beizusitzen.
- Ganz besonders danke ich PD Dr. Volker Thiel für seine Geduld und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft sowie für die nette Zusammenarbeit. Seine Ideen und Hilfestellungen haben mich bei meiner Arbeit sehr unterstützt.
- Weiterhin bin ich Reinhard Maier für seine endlose Geduld und Hilfestellung bei der Einführung in die Welt des *fluorescence activated cell sortings* sowie für die Durchführung der FACS-Analysen zu tiefen Dank verpflichtet.

- Ferner bedanke ich mich bei Gergely Tekes für die Einführung in das coronavirale revers-genetische System.
- Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen Svenja, Tanja und Babsi für ihre vielfältige Hilfe, ihre Unterstützung und ihren Beistand bei Vorträgen. Babsi, ich danke dir für deine fachliche Betreuung und die medizinische Versorgung von Elvis, Toni und Kobe. Svenja, dir danke ich für deine technische Unterstützung und die fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche in der versuchsfreien Zeit. Unser D-Day und die Späßchen im Labor haben mich nach gescheiterten Versuchen immer wieder aufgebaut. Meiner Leidensgenossin Tanja danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die regen Diskussionen über unsere Ergebnisse und die Möglichkeit des Frustrationsabbaus im Labor und natürlich montags beim BBP. Deine schwäbisch-lustige Art munterte mich auch nach negativen Ergebnissen und langen Stunden im Labor immer wieder auf.
- Ein herzlicher Dank gilt meinen Freunden, insbesondere Verena Kosing und Stefan Roth für Eure Unterstützung und Euer immer offenes Ohr. Immer wenn ich schlecht gelaunt anrief, habt ihr mich stets aufgebaut und euch in guten Zeiten mit mir gefreut und in schlechten Zeiten mein Leid mit mir geteilt. Vielen Dank, dass ihr an mich geglaubt und für die erforderliche Abwechslung gesorgt habt.
- Meinem Freund Carsten danke ich von ganzem Herzen für seine endlose Geduld und liebevolle Unterstützung sowie für seinen Rückhalt und die Motivation, die mich aufbaute, wenn mal wieder nichts geklappt hat. Du hast mich stets bestärkt, wenn ich an mir gezweifelt habe. Ich liebe dich!
- Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mich uneingeschränkt unterstützt und immer an mich geglaubt haben.